Die lymphozytotoxische Wirkung von 1-Methyl-4-Nitro-5-Chloro-Imidazol (MNCI) und seine chemosensibilisierende Interaktion mit den zytostatisch wirksamen Antimetaboliten Methotrexat und 5-Fluorouracil

Reingard Herbst
1988

Aus der Medizinischen Klinik III, Klinikum Großhadern
der Universität München
Vorstand : Prof. Dr. W. Wilmanns

DIE LYMPHOZYTOTOXISCHE WIRKUNG VON 1-METHYL-4-NITRO-5-CHLORO-IMIDAZOL (MNCI) UND SEINE CHEMOSENSIBILISIERENDE INTERAKTION MIT DEN ZYTOSTATISCH WIRKSAMEN ANTIMETABOLITEN METHOTREXAT UND 5-FLUOROURACIL

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Reingard Herbst

aus

Augsburg

1988

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. H. Sauer

Mitberichterstatter : Prof. Dr. W. Wilmanns

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter : ./.

Dekan : Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 14.04.88

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen

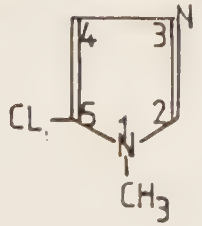
AZA	=	Azathioprin
DNS	=	Deoxyribonukleinsäure
5-FU	=	5-Fluorouracil
GSH	=	Glutathion (γ-Glutamyl-cysteinyl-glycin)
GZ(K)	=	Gesamtzellzahl in Bezug auf die Kontrolle
LS_2	=	undifferenzierte Lymphoblastenkultur
MNCI	=	1-Methyl-4-Nitro-5-Chloro-Imidazol
6-MP	=	6-Mercaptopurin
MTX	=	Methotrexat = Amethopterin
NADP	=	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
O_2	=	molekularer Sauerstoff
PLD	=	Potentially lethal damage
Redox-	=	reduzierend und oxidierend wirkend
TZ(S)	=	Tote Zellen unter Einwirkung der jeweils untersuchten Substanz

1 Einleitung

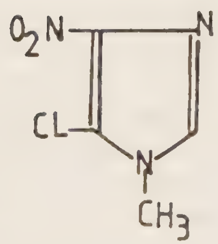
1.1 1 - Methyl - 4- Nitro - 5 -Chloro - Imidazol (MNCI) und andere Nitroimidazole

Das Immunsuppressivum Azathioprin (AZA) wird intrazellulär zu verschiedenen 5-substituierten Imidazolderivaten gespalten. Außerdem entsteht 6-Mercaptopurin (6-MP). Drei in vitro synthetisierte reagible Imidazole, die mögliche Zwischenstufen im AZA-Metabolismus sind, zeigt die Abbildung 1.

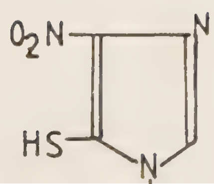
Abb. 1 : Imidazol - Derivate des Azathioprin



1-Methyl-5-Chloro-Imidazol



1-Methyl-4-Nitro-5-Chloro-Imidazol
= MNCI



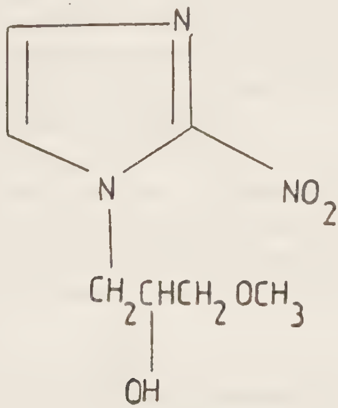
1-Methyl-4-Nitro-5-Thio-Imidazol

Ziel dieser Arbeit ist der Nachweis der zytostatischen und zytotoxischen Aktivität von MNCI auf menschliche Lymphoblastenkulturen, die Darstellung des Wirkungseintritts ab einer definierten Schwellenwertkonzentration und das Aufzeigen der Möglichkeit, durch die kombinierte Verabreichung von zwei ineffektiven Zytostatikakonzentrationen, einen deutlich erkennbaren, wachstumshemmenden bzw. zytotoxischen Effekt erzielen zu können (= Chemosensibilisierung).
Des weiteren soll die quantitative Verstoffwechselung des Azathioprins (AZA) Gegenstand einer Untersuchungsreihe sein : 6 - Mercaptopurin (6-MP) ein nachgewiesenes Stoffwechselprodukt des Azathioprins, soll dabei in einem Konzentrations-Wirkungsprofil mit äquimolaren Mengen von AZA in Vergleich gebracht werden, um eine Aussage dahingehend machen zu können, ob 6 - MP bei der Spaltung aus AZA in äquimolarem Verhältnis entsteht.

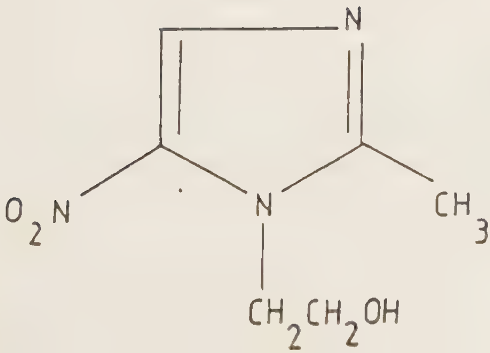
Es scheint erforderlich, zunächst am Beispiel der bekannten Nitroimidazole "Misonidazol" bzw. "Metronidazol" Struktur, Wirkungen und klinischen Einsatz sogenannter Sensitizer zu erläutern.
Als "Sensitizer" werden heute chemische Verbindungen bezeichnet, die trotz unterschiedlichem, zum Teil für viele Substanzen noch nicht erforschtem, Wirkungsmechanismus den gleichen Zieleffekt aufweisen : Sie "sensibilisieren" die unterschiedlichsten, widerstandsfähigsten Zellen mittels einer Art "Vorschädigung" für weitere schädigende Agentien und ermöglichen erst durch ihre Anwesenheit deren vollständige Zerstörung. Da verschiedene physikalische, wie chemische Faktoren zellschädigend wirken können und die derzeitige Therapie maligner Erkrankungen sich einerseits auf die Bestrahlung,

andererseits auf die Chemotherapie stützt, werden "Sensitizer" auch als Radio- oder Chemosensitizer bezeichnet.
In jedem Fall dient der Sensitizer dazu, eine Teilschädigung an der unerwünschten Zellpopulation herbeizuführen bzw. eine schnelle Reparatur durch entsprechende Systeme der Zelle zu verhindern. Das noch weitgehend unbekannte Gebiet der Wirkungsmechanismen, denen sich der "Sensitizer" bedienen kann, soll in den Punkten 4.1.1.1 - 4.1.1.3 S. 76 - 87 abgehandelt werden.

Abb. 2 : Miso- und Metronidazol, Strukturdarstellung



Misonidazol



Metronidazol

1.1.1 Aktualität von Nitroimidazolen

Metronidazol und Misonidazol waren bereits in den Sechziger Jahren für ihre Wirksamkeit bei Anaerobier-Infektionen bekannt (1, 17).
Daneben sind sie heute die am häufigsten angewandten Radiosensitizer.

1.1.1.1 Entwicklung von Radiosensitizern

Die Suche nach radiosensibilisierenden Stoffen setzte mit der Entdeckung Greys et al. 1953 (3, 12, 43, 65) ein, daß in den inneren Bereichen eines Tumors die Existenz von hypoxischen Zellen, die nicht ausreichend an die Versorgung durch die Blutgefäße angeschlossen sind, als entscheidender Faktor für die teilweise Ineffektivität der Radiotherapie maligner Erkrankungen angesehen werden darf.

In mehreren Experimenten wurde die Resistenz hypoxischer Zellen gegen Bestrahlung dargelegt, nicht nur in Zellkulturen, sondern auch in Tumoren tierischer Herkunft und in hypoxischer, menschlicher Haut (33, 35, 65).

Bush et al. zeigten 1978 in einer Behandlungsanalyse von 2803 Patientinnen mit Zervixkarzinom, daß mit zunehmendem Oxygenierungsgrad der Tumorzellen auch ihre Empfindlichkeit gegenüber Bestrahlung wächst (26, 46, 60, 78).

Weitere Untersuchungen zeigten, daß das Verhältnis der Absterberate von euoxischen zu hypoxischen Zellen bei Bestrahlung etwa 3 : 1 beträgt, d. h. die Anwesen-

heit von Sauerstoff in den zu erfassenden Zellen verringerte die Strahlendosis auf 1/3 (3, 26, 46, 60).

Eine Reihe von Methoden wurde entwickelt, um die Widerstandskraft hypoxischer Zellen zu brechen, mit dem Grundgedanken, den Effekt des Sauerstoffs zu imitieren.
Die vier wichtigsten Möglichkeiten sollen hier kurz beschrieben werden :

I) Fraktionierte Bestrahlung :

Die Gesamt-Strahlendosis wird in mehrere Einzelfraktionen aufgeteilt. Initial werden so die sensibleren oxygenierten Zellen getroffen, während die hypoxischen im bestrahlungsfreien Intervall eine Reoxygenierung erfahren können und somit bei den folgenden Bestrahlungen mit größerer Wahrscheinlichkeit getroffen werden können. Diese Methode kann mit den im Folgenden aufgeführten in Kombination gebracht werden (3, 26, 40).

II) Hochdruck-Sauerstofftherapie :

Diese Technik ist für die Klinik nur von eingeschränktem Nutzen, da die benötigten Druckkammern raumfordernd und teuer sind, die Methode selbst noch unerwünschte Nebeneffekte aufweist (46, 65, 86, 99).

III) Bestrahlung mit linearer Energieübertragung (LET) :

Für diese Technik werden Neutronen und andere energiereiche Teilchen verwendet. Auch diese Bestrahlungsart erfordert vor allem teures Gerät (65).

IV) Radiosensibilisierende Substanzen = Radiosensitizer :

Sie sensibilisieren hypoxische Zellen für die Bestrahlung, vergleichbar mit der Wirkung von Sauerstoff.
Ihr Vorteil liegt in ihrer Selektivität für sauerstoffarme Zellen und in der Tatsache begründet, daß sie nicht während des Zellmetabolismus verbraucht werden, wie dies für O_2 zutreffend wäre (5, 6, 8, 65).
Im Vergleich zu II) und III) ist die Methode finanziell die günstigste und auch die, der für die Zukunft eine gewisse Bedeutung beigemessen werden kann.

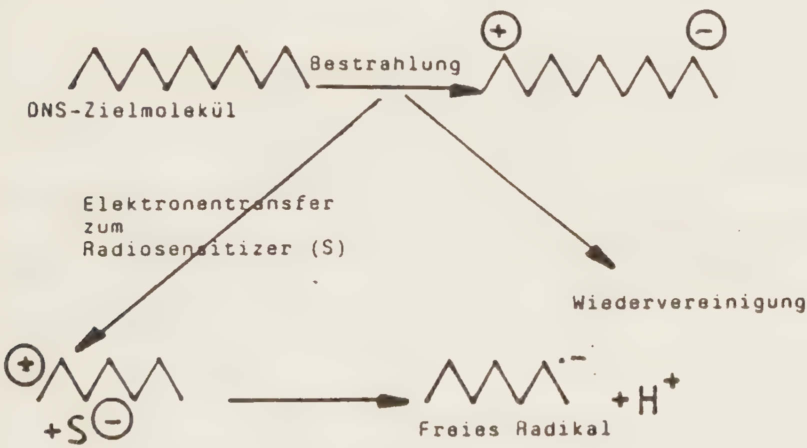
Zum Verständnis der Interaktionen zwischen einem Radiosensitizer und dem bestrahlten DNS - Molekül sollen zwei Modelle dienen (3) :

I) Die Bestrahlungsenergie bewirkt die direkte Polarisierung am DNS-Molekül.
Anion und Kation können sich entweder wieder vereinigen oder aber, das Elektron kann aufgrund seiner energetischen Aufladung an der DNS entlangwandern (1, 2, 3, 7).
Steht dann ein Radiosensitizer mit starker Elektronenaffinität zur Verfügung, so wird er dieses Elektron anziehen und das verbliebene Kation damit zum freien Radikal werden.

II) Ein zweites Modell postuliert den direkten und den indirekten Weg der Wirkung von Bestrahlungsenergie auf das DNS-Molekül durch Reaktionen in seiner unmittelbaren Umgebung.

Auch hierbei sind Elektronen, Hydroxyl - Radikale und Radikalbildung in der DNS selbst die hervorragenden Mechanismen, die wiederum per Reduktion rückgängig gemacht oder per Oxidation fixiert werden können (3, 7, 45).
Die Abbildungen 3 und 4 stellen die durch Bestrahlung möglichen Effekte dar.

Abb. 3 : Bestrahlungseffekte am DNS - Zielmolekül



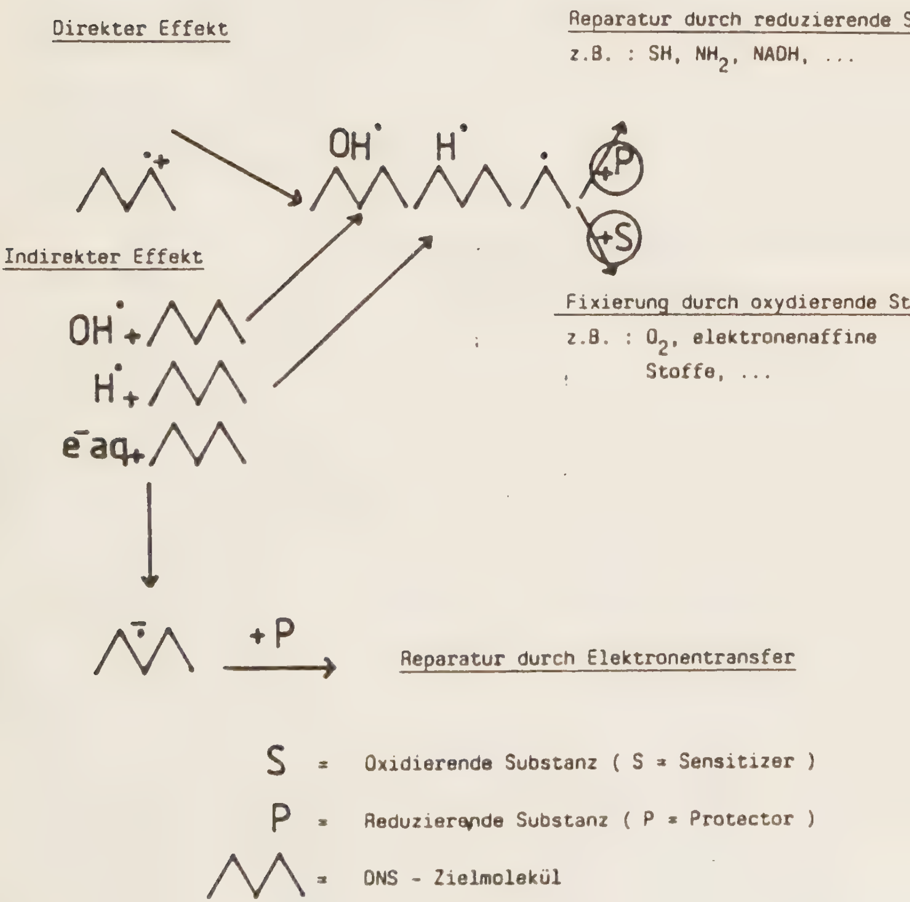
S = Radiosensibilisierende Substanz = Radiosensit

⊕ = Kation, durch Bestrahlung entstanden

⊖ = Anion, durch Bestrahlung entstanden

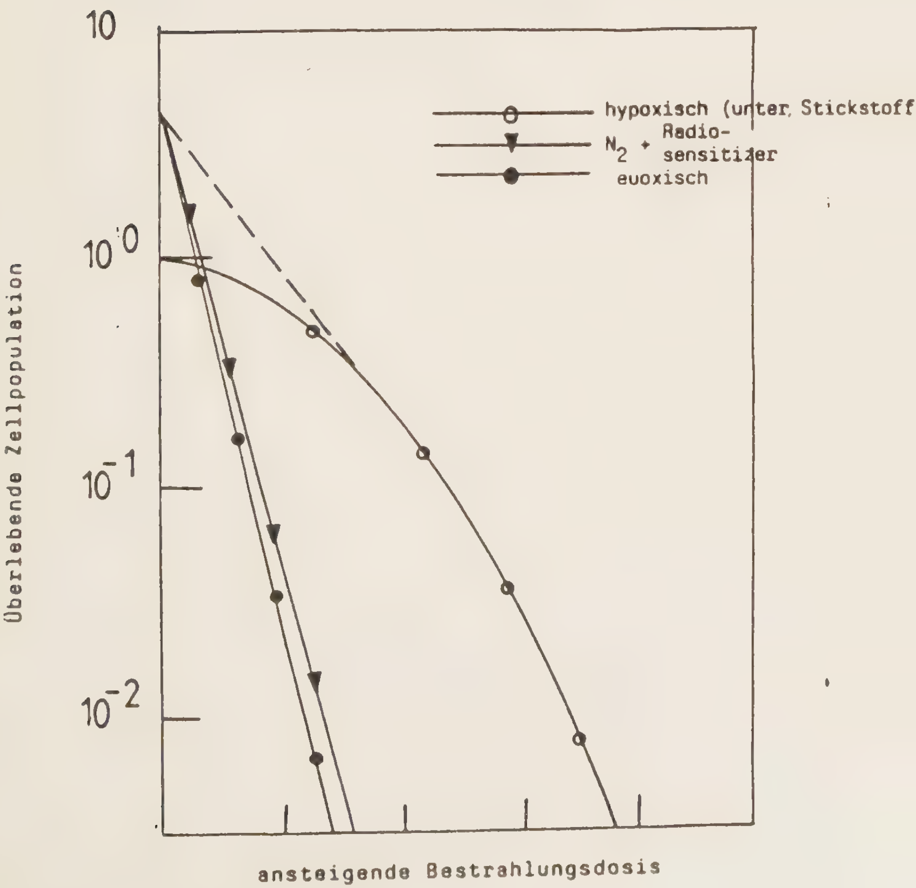
 = DNS - Zielmolekül

Abb. 4 : Darstellung einiger wichtiger intrazellulärer Redox - Prozesse mit freien Radikalen



Sämtliche, im Laufe der vergangenen Jahre entwickelten Radiosensitizer sind im Prinzip in ihrer Wirkung dem molekularen Sauerstoff ähnlich, auch, wenn sie sich untereinander in Mechanismus und biologischen Effekten unterscheiden.

Abb. 5 : Effekte der Bestrahlung euoxischer, hypoxischer und radiosensibilisierter hypoxischer Zellen (3)



Mit Metronidazol und Misonidazol waren zwei Substanzen gefunden, deren Nitrogruppe durch Reaktion mit bestrahlungsinduzierten Radikalen, einen sauerstoffähnlichen Effekt versprach, d. h. mittels Oxidation die gesetzte DNS-Schädigung fixieren konnte.
Eine weitere Besonderheit der Radiosensitizer liegt darin, daß sie spezifisch auf hypoxische Zellen einwirken können und auch selbst freie Radikale bilden oder Redox-Reaktionen herbeiführen können, wie zahlreiche Versuche mit Metro- und später Misonidazol zeigten (9, 11, 15, 18, 37, 40, 57). In Punkt 4.1 soll hierauf näher eingegangen werden.

1.1.1.2 Korrelation : Stellung der Nitrogruppe/ Elektronenaffinität

Mit der Entwicklung weiterer Nitroimidazole war die Feststellung verknüpft, ob die Effektivität der radiosensibilisierenden Eigenschaften eng mit der Elektronenaffinität des Stoffes vergesellschaftet ist (16, 19, 21, 38, 41).
Adams et al. definierten 1976 für eine Reihe von Stoffen, ihre radiosensibilisierende Fähigkeit mit der Elektronenaffinität gemeinsam betrachtet, durch folgende Gleichung :

$$- \log C = a + b\, E\,\frac{1}{7}$$

C stellt hierbei die Konzentration dar, die nötig ist, um einen standardisierten Radiosensibilisierungseffekt zu erzielen, $E\,\frac{1}{7}$ steht für das Ein - Elektronen - Reduktionspotential bei pH 7, einem Maß für die Elektronenaffinität, und a + b sind konstante Größen.
Für 44 Stoffe, einschließlich der 2-, 4- und 5-Nitroimidazole, Nitrofurane und Nitrobenzone, sowie für Sauerstoff hat diese Gleichung Gültigkeit. Unter den Imidazolen verringerte sich die Elektronenaffinität in der Reihenfolge :

2-Nitro > 5-Nitro > 4-Nitroimidazole;

Je weniger negativ der $E\,\frac{1}{7}$ - Wert bzw. das Redox - Potential, desto stärker der radiosensibilisierende Effekt und umso bedeutender die Elektronenaffinität (13, 25, 32, 60, 65) :

E $\frac{1}{7}$ Werte	für	O_2	= -155 mV
	für	2-Nitroimidazole wie Misonidazol	= -389 mV
	für	5-Nitroimidazole wie Metronidazol	= -486 mV
	für	5-substituierte-4-Nitroimidazole	= -550 mV;

Die Entwicklung von Verbindungen mit noch besserer Elektronenaffinität, als sie für Misonidazol bekannt ist, lag nahe, wurde aber durch die Tatsache gebremst, daß auch die Toxizität der Substanzen mit den verbesserten Redox-Eigenschaften zunimmt (3, 10, 22, 30, 31, 65).
Durch elektronenanziehende Substituenten am Imidazolring kann ebenfalls die Effektivität des Radiosensitizers erhöht werden, damit jedoch auch seine Toxizität (27, 41, 48, 65, 73, 84).
Auch kann die tatsächliche Wirkung des jeweiligen Substituenten nicht immer mit Sicherheit vorausgesagt werden (84, 88, 92).
Als Beispiel hierzu diene der Versuch von Adams et al. 1980, durch Variation der Seitengruppe der N-substituierten 2-Nitroimidazole, die Wirkung auf die Elektronenaffinität zu untersuchen :
Hierbei war keine Beeinflussung des E $\frac{1}{7}$ - Wertes nachzuweisen, solange die variierenden Substituenten durch mindestens ein C - Atom von der Nitrogruppe des Imidazolringes getrennt blieben (3, 43, 65, 84, 88).
Dies galt auch für die Änderung in der Kettenlänge der Seitengruppe (3, 43, 65, 84, 88).
Trotz gleichbleibendem Redox-Potential war dennoch mit zunehmender Kettenlänge (= n) auch eine Zunahme der radiosensibilisierenden Eigenschaften in menschlichen Zellen nachweisbar (3, 43, 65, 84, 88), mit einem Maximum bei n = 5.

Mit dieser verbesserten Effektivität der N-substituierten 2-Nitroimidazole wuchs auch ihre Toxizität, was eine nutzbringende in - vivo Anwendung wiederum fragwürdig erscheinen ließ.

1.1.1.3 Besondere Stellung der 5-substituierten 4-Nitroimidazole

In zahlreichen Untersuchungsreihen erwiesen sich die 5-substituierten 4-Nitroimidazole als besonders wirksam.
An 4-Nitroimidazolen mit einem Thioester oder einer Sulfonyl-Gruppe am C_5-Atom konnte eine vielfach stärkere Wirkung nachgewiesen werden, als sie aufgrund ihrer Elektronenaffinität von $E \frac{1}{7}$ = -490 mV hätte erwartet werden können.
Besonders starke sensibiliserende Eigenschaften konnten in diesen Versuchen auch für 1-Methyl-4-Nitro-5-Chloro-Imidazol (= MNCI) nachgewiesen werden, das in seiner Wirkung auf menschliche Zellen in-vitro mit der des Sauerstoffs vergleichbar ist (18, 56, 65, 77, 92).

Die radiosensibilisierenden Eigenschaften von MNCI gelten als 100-fach stärker, als die von Misonidazol, trotz des nur geringfügig positiveren Redoxpotentials von -342 mV im Vergleich zu -389 mV für Misonidazol.

Auch für diesen neu entwickelten Sensitizer konnte aber eine größere Toxizität als für Misonidazol vor allem auf euoxische Zellen festgestellt werden (43, 65, 96).
Als Erklärungsansatz für die besonderen Qualitäten der 5-substituierten-4-Nitroimidazole dient heute die Annahme, daß zum elektronenaffinen Aspekt möglicher-

weise eine bioreduktive Alkylierung durch die orthograd substituierten Nitroverbindungen hinzutritt (63, 65).

1.1.2 Begrenzende Faktoren für den Einsatz von Nitroimidazolen als Radiosensitizer

Die klinische Nutzbarkeit der als Radiosensitizer eingesetzten Nitroimidazole wie "Metronidazol" und "Misonidazol" wird durch einige Faktoren beschränkt, wie z. B. ihre Toxizität, ihren Metabolismus und ihre Löslichkeit in Wasser.

1.1.2.1 Toxizität

Schon bald wurde in klinischen Versuchsserien die Neurotoxizität für den Einsatz der Nitroimidazole als ein begrenzender Faktor erkannt.

Bei Verabreichung hoher Einzeldosen können Krampfanfälle ausgelöst werden; unter der Therapie mit mehrfacher Anwendung kleinerer Konzentrationen, wie z. B. bei fraktionierter Bestrahlung, tritt oftmals eine periphere Neuropathie mit Zittern der Hände, Fingerkribbeln und Gefühlsstörungen bis -verlust auf.
Symptome von Seiten des Zentralnervensystems können folgen. Eine quantitative zytochemische Methode zum meßbaren Nachweis der Neurotoxizität wurde 1980 von Clarke et al. erarbeitet :
Dabei korrelieren zunehmende periphere Neuropathie mit ansteigender Aktivität lysosomaler Enzyme. Gemessen wurde die ß - Glucuronidase - Aktivität im N. ischiadicus von Mäusen (65).

In vivo gilt als die maximal tolerierte Dosis für Misonidazol 12 g/m² Körperoberfläche über drei Wochen oder 24 g für eine 75 kg schwere Person (65).

Die für gewöhnlich angewandten Mengen von 2 - 3 g/m² ergeben lediglich einen Plasmaspiegel von 0,5 x 10^{-3}M (65). Da in-vitro Versuche zeigen konnten, daß Misonidazol erst in Konzentrationen von 1,5 - 5x10^{-3}M sein Wirkungsoptimum hinsichtlich Radiosensibilisierung und auch hinsichtlich anderer Qualitäten, die im Kommenden noch abgehandelt werden sollen, entfaltet, können aufgrund der Toxizität die für eine effektive, klinische Behandlung notwendigen Konzentrationen nicht erreicht werden.
Hierin mag ein Grund für die dürftigen Erfolge im klinischen Bereich mit Nitroimidazolen liegen.

Auch ein mögliches karzinogenes Potential, wenn es auch dem mancher anderer Chemotherapeutika nachsteht, ist für die Radiosensitizer bei Langzeitanwendung nachgewiesen worden (3, 91). Dieser, der Nitrogruppe zugeschriebene, Effekt gilt als Grund zur besonderen Beobachtung bei langandauernder Therapie mit Nitroimidazolen.

Die Toxizität von Radiosensitizern, die in ihrem Aufbau eine oder mehrere Nitrogruppen beinhalten, wurde mit ihrer Elektronenaffinität verglichen und führte zu dem Schluß, daß die Stoffe mit den stärksten elektronenanziehenden Eigenschaften auch die größte Toxizität nach sich ziehen (65, 93, 95, 100).

Dieser Effekt spiegelt den Zusammenhang wider, wie er zwischen Elektronenaffinität und radiosensibilisierenden Eigenschaften besteht, was jedoch nicht als Hinweis für den gleichen Mechanismus von Toxizität

einerseits und Radiosensibilisierung andererseits gedeutet werden sollte.
Für die Toxizität gilt, daß sie von der Zellart, der Temperatur und von der Anwesenheit verschiedener Stoffe im Medium der in vitro-Kultur abhängig ist, wie z. B. von der Anwesenheit von Säuren oder von Serum (42, 50, 51).

1.1.2.2 Metabolismus

Die Metabolisierungsrate eines Radiosensitizers bestimmt seine Toxizität und seine Effektivität (65).
Ein idealer Sensitizer sollte nur zum Zeitpunkt der Bestrahlung in seiner Maximalkonzentration vorliegen und danach möglichst schnell eliminiert bzw. metabolisiert werden. Da die Radiosensibilisierung ein schneller, temperaturabhängiger Prozeß ist (28, 43), würde ein nur Millisekunden anhaltendes Konzentrationsverteilungsmaximum genügen.
Damit könnte die therapeutische Nutzbarkeit gesteigert werden, deren begrenzender Faktor, die Toxizität, ein Produkt aus Konzentration und Zeit (Expositionsdauer) darstellt. Leider kann dies nur eine theoretische Überlegung darstellen, da ein Konzentrationsverteilungsmaximum in Bruchteilen von Sekunden für die Praxis nicht realisierbar sein kann.
Für Metronidazol ist eine durchschnittliche Halbwertszeit von 7,3 Stunden nach oraler Gabe und bei intravenöser Verabreichung nachgewiesen (71, 94), was im Hinblick auf die Toxizität als lang zu bewerten ist.

Da keine nennenswerte Proteinbindung für Metronidazol bekannt ist, weist es einen hohen Verteilungskoeffizienten von 83 % des Körpergewichts auf. Es ist ebenso in Drüsensekreten wie im Liquor nachweisbar. Die Verstoffwechslung erfolgt zu 80 % in der Leber.

Für das in vorliegender Arbeit relevante MNCI kann der Metabolismus nur bis zu seiner Entstehung verfolgt werden. Dabei dienen Versuche am Hund mit C^{14} markiertem Azathioprin als Grundlage (43).
MNCI selbst wird weiter verstoffwechselt, was durch alleinige Gabe des Stoffes verifiziert werden konnte, der dann nur zu einem geringen Teil als Ausscheidungsprodukt auftritt (43).
Als nachgewiesene Stoffwechselprodukte seiner Muttersubstanz AZA gelten (43) :

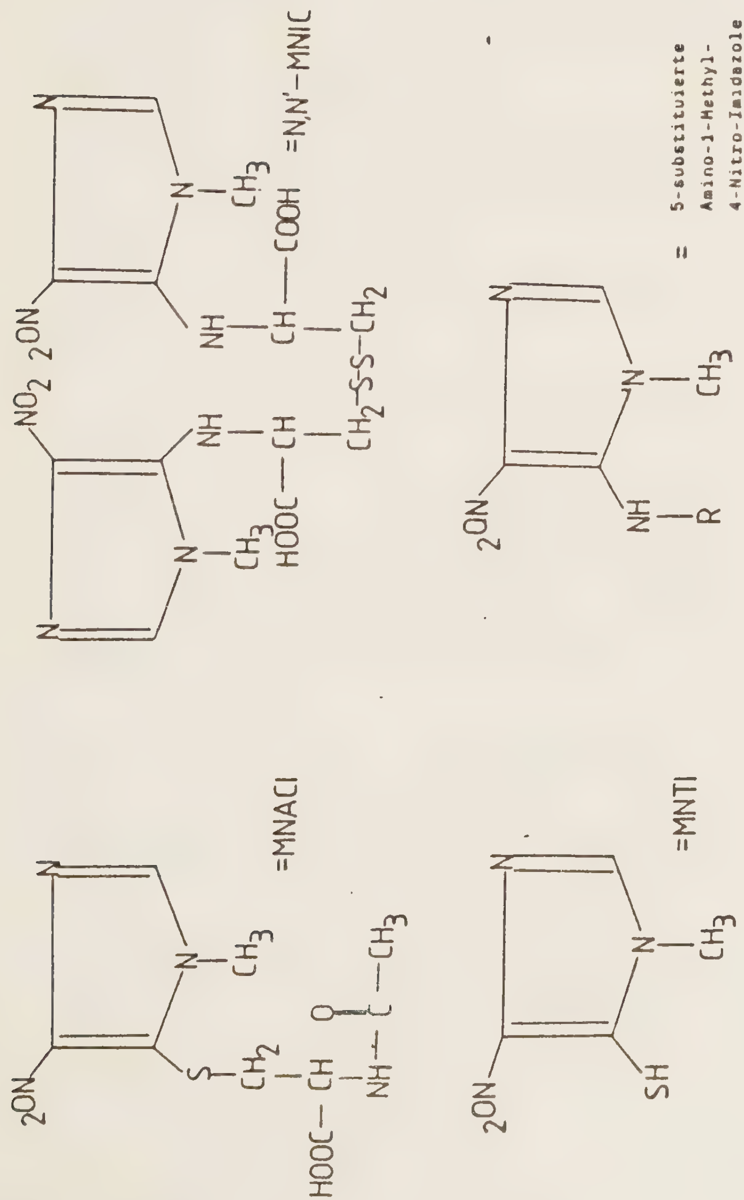
MNACI = (1-Methyl-4-Nitro-5-(N-Acetyl-5-Cysteinyl)-Imidazol),

N,N`-MNIC =
(N,N`-(S-(1-Methyl-4-Nitro)Imidazolyl)Cystin)
als das dominierende Ausscheidungsprodukt,

MNTI = (1-Methyl-4-Nitro-5-Thioimidazol),

und 5-substituierte Amino-1-Methyl-4-Nitro-Imidazole;

Abb. 6 : Strukturformeln der Ausscheidungsprodukte des Imidazolstoffwechsels



1.1.2.3 Löslichkeit in Wasser und Lipophilie

Da Radidsensitizer in vivo Anwendung finden, gelten ihre Löslichkeit in Wasser und ihr lipophiles Verhalten als weitere Faktoren, die die therapeutische Nutzbarkeit beeinflussen können.
Wie wichtig ein optimales Gleichgewicht von hydrophilen und lipophilen Eigenschaften für Nitroimidazole in ihrer Wirkung als Radiosensitizer ist, wiesen Brown und Lee 1980 nach (18, 20, 21, 22).
Ihr Verteilungskoeffizient spielt hinsichtlich der relativen Stoffkonzentration im Tumorgewebe im Vergleich zu anderen Geweben eine bedeutende Rolle (20, 21, 22).
Da die gleichmäßige Verteilung in allen Geweben nicht Ziel der sensibilisierenden Eigenschaften eines "Sensitizers" sein kann, sondern die Anreicherung an Orten gedrosselter Blutzufuhr und reduzierten Stoffwechsels, wie dies bedeutende Eigenschaften hypoxischer Zellen sind, muß eine gewisse Lipophilie mit nachfolgend erleichterter Adhäsion an Zellmembranen ebenso gewährleistet sein, wie eine Hydrophilie für den Transport im Blutkreislauf und im wässrigen Milieu der Zelle unentbehrlich ist.

Misonidazol ist nur bis zu einer Konzentration von 26 mg/ml löslich, Metronidazol hingegen weist eine noch geringere Wasserlöslichkeit auf (65).
Mit zunehmender Wasserlöslichkeit wird auch eine abnehmende Neurotoxizität festgestellt (65).

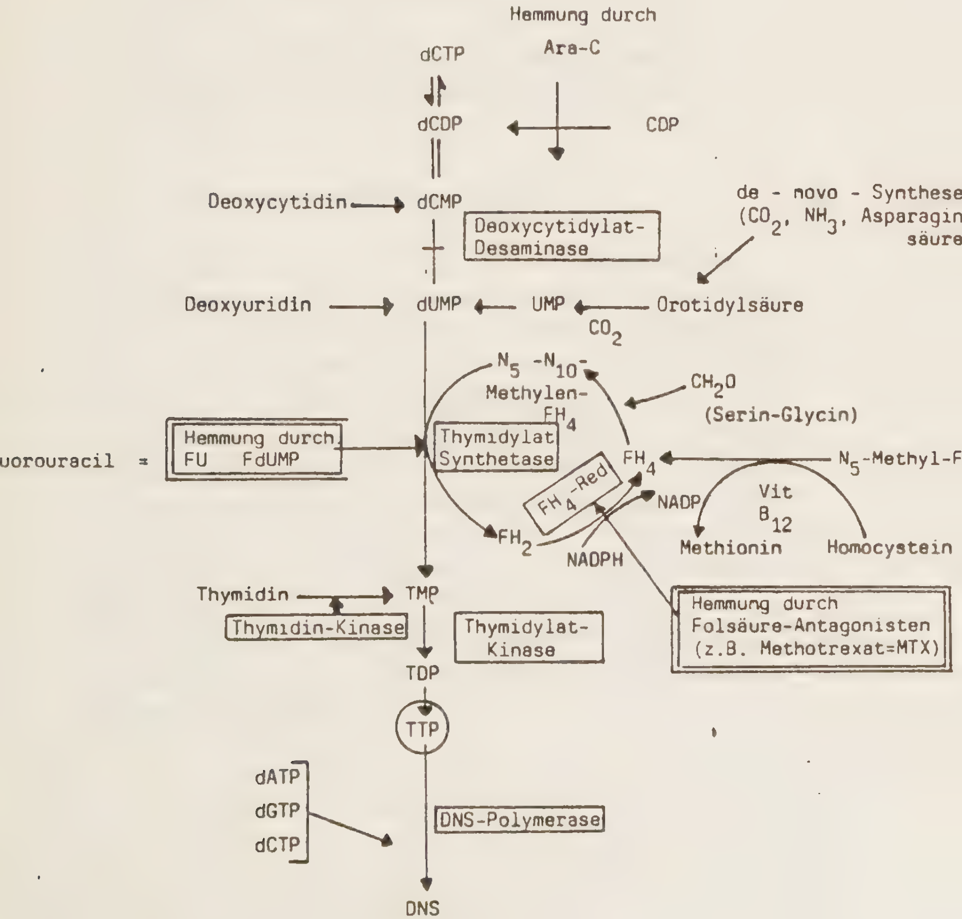
Das lipophile Verhalten von Stoffen determiniert ihre Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden.

Auch diese Überlegung muß in der Entwicklung neuer Nitroimidazole in Betracht gezogen werden, sofern sie für die Bestrahlung intrakranieller Tumoren von Nutzen sein sollen.

1.2 Methotrexat = Amethopterin = MTX

Methotrexat zählt zur Gruppe der Antimetaboliten. Die Wirkung von Antimetaboliten beruht darauf, daß sie als Analoge kompetitiv an Stelle der physiologischen Substrate Enzymreaktionen hemmen.

Abb. 7 : Verschiedene Angriffspunkte von Antimetaboliten in der Thyminnukleotidsynthese



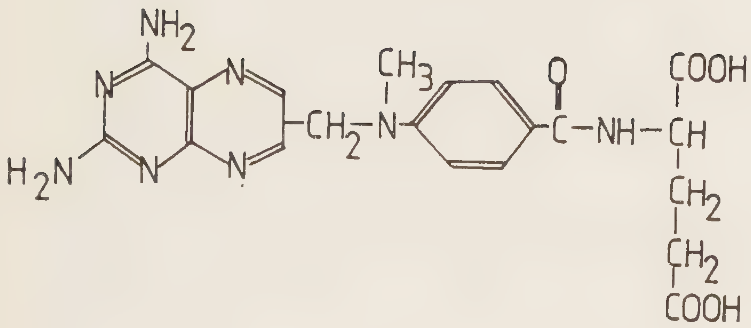
Die Antitumorwirkung der Antimetabolite ist umso größer, je höher die Wachstumsrate eines Tumors ist.

Die Dosis-limitierenden toxischen Nebenwirkungen der Antimetabolite betreffen vor allem rasch wachsende Gewebe, wie z. B. das Darmepithel, das Knochenmark usw. Da Antimetabolite rasch und kurzfristig wirken, können durch geeignete Gegenmaßnahmen (Antidot) ihre toxischen Nebenwirkungen gezielt behandelt werden.
Nur wenige der unzähligen, synthetisierten Antimetabolite haben bisher einen festen Platz in der Klinik erreicht.
So z. B. die Untergruppe der Folsäureantagonisten, heute angeführt von der Substanz Amethopterin = Methotrexat.

1.2.1 Indikationsbereiche für MTX

Die seit den frühesten Anfängen der antineoplastischen Chemotherapie verwendeten Folsäureantagonisten haben ihren festen Platz in der Behandlung maligner Tumoren und von Hämoblastosen gewonnen. Das von Farber erstmalig in der Klinik eingesetzte Aminopterin wird heute jedoch kaum mehr verwendet. Es wurde durch das weniger toxische Amethopterin = Methotrexat ersetzt, das vor allem in der Behandlung akuter Leukosen, lymphatischer Systemerkrankungen, beim Chorionepitheliom und auch noch bei einigen anderen malignen Tumoren eingesetzt wird.
Die intrathekale Verabreichung von MTX hat vor allem für die Prophylaxe und Behandlung einer Meningiosis leucaemica Bedeutung.

Abb. 8 : Chemische Stukturformel für Methotrexat



1.2.2 Pharmakokinetik und Metabolismus von MTX

1.2.2.1 Resorption, Verteilung und Ausscheidung von MTX

Bis zu einer Dosierung von 30 mg/m² wird Methotrexat per os nahezu vollständig resorbiert. Die höchsten MTX-Blutspiegel werden nach 1 - 2 Stunden erreicht. Mit steigenden MTX-Dosen vermindert sich die Absorption proportional zur verabreichten Dosis.
Nach intrathekaler, intramuskulärer oder intraperitonealer Applikation werden bereits nach 15 bis 30 Minuten die höchsten MTX-Konzentrationen im Blut erreicht.Diese können nach intrathekaler Applikation für eine wesentlich längere Zeitdauer gemessen werden als nach intravenöser Verabreichung. Dies kann klinisch dann auch zu ausgeprägteren toxischen Nebenwirkungen führen als nach i.v. Applikation bei gleicher Dosierung (81).

Die Verteilung und Ausscheidung von Methotrexat erfolgt in 3 Phasen.
Die Verteilung von MTX in die verschiedenen Organkompartimente führt zu einer ersten Blutspiegel-Halbwertszeit von 0.75 Stunden (81). Die Halbwertszeit der renalen Elimination von Methotrexat beträgt etwa 2 - 3 Stunden (81). Bei niedrigen MTX-Spiegeln im Blut (10^{-7}M), wie sie vor allem 1 - 2 Tage nach hochdosierter MTX-Therapie beobachtet werden, findet sich aufgrund des enterohepatischen Kreislaufes eine verlängerte Halbwertszeit von 10 Stunden. Da in den verschiedenen Wechselgeweben eine DNS-Synthesehemmung bis zu einer MTX-Konzentration von 10^{-8} M beobachtet wird, kann eine individuelle Verlängerung dieser

"terminalen Halbwertzeit" für toxische Nebenwirkungen verantwortlich gemacht werden.
Die höchste Anreicherung von MTX erfolgt in der Leber und in den Nieren (81, 89).

Etwa 50 % des Plasma-MTX binden sich schwach an Proteine, vor allem an Albumin.
Innerhalb der ersten 24 Stunden nach niedrigdosierter MTX-Applikation findet sich die Substanz unverändert im Urin, so daß den einzelnen Stoffwechselvorgängen des MTX im Organismus klinisch nur wenig Bedeutung geschenkt werden muß. In Abhängigkeit von der verabreichten Dosis können jedoch verschiedene metabolische Vorgänge nachgewiesen werden (81, 89).

Die Exkretion von MTX in niedrigen Dosen erfolgt fast ausschließlich renal (90 % innerhalb von 24 Stunden) durch Filtration.
In höheren Dosen wird Methotrexat jedoch auch aktiv durch die Tubuli sezerniert.
Die enterale Ausscheidung ist minimal (1 - 2 % im Stuhl) und gewinnt nur nach höherer Dosierung und peroraler Verabreichung an Bedeutung (z. B. 28 % bei einer Dosis von 80 mg MTX/m² p.o.) (81, 89).

1.2.2.2 Wechselwirkungen von MTX mit anderen Pharmaka

Salicylate und Sulfonamide können Methotrexat aus der Eiweißbindung verdrängen und somit die Organverteilung sowie die Exkretion beschleunigen (81, 89).

Verschiedene Untersuchungsergebnisse sprechen dafür, daß die zelluläre Aufnahme von MTX durch Vincristin verstärkt, durch Cephalotin und Hydrokortison aber vermindert wird (81, 89).
Widersprüchliche, tierexperimentelle Ergebnisse liegen über den Einfluß von Allopurinol auf den zytotoxischen Effekt von MTX vor.
Klinisch konnte bisher weder eine Verminderung des Antitumoreffektes noch eine Verstärkung der toxischen Nebenwirkungen von Methotrexat durch Allopurinol beobachtet werden.

Der - toxischen - Wirkung von MTX kann durch die gleichzeitige Gabe von Citrovorumfaktor = Folinsäure = 5 - Formyl- Tetrahydrofolsäure = Leucovorin^{R}), der die durch MTX bedingte Blockierung der Dihydrofolsäurereduktase umgehen kann, entgegengewirkt werden ("Rescue") (81).
Die Leucovorin-Dosis richtet sich nach der applizierten MTX-Dosis und sollte solange verabreicht werden, bis die Plasmakonzentration von MTX unter 10^{-8} M abgesunken ist. (81)

Abgesehen davon kann man die Myelosuppression durch mittelhohe MTX-Dosen (120 - 300 mg MTX/m² i.v.) mit Hilfe von Asparaginase, die 24 Stunden später verabreicht wird, unterdrücken (81).
Prinzipiell wären die toxischen Wirkungen von MTX aber auch durch Thymidin oder Carboxypeptidase G_1 aufzuheben.
Diese Therapie steht jedoch erst am Anfang ihrer Erprobung (81, 89).

1.2.3 Wirkungsmechanismus von MTX

Der Angriffspunkt der Folsäureantagonisten in der Thyminnukleotid-Synthese ist schmeatisch in Abb. 7 bereits dargestellt worden.
Die hohe Affinität von MTX an die Dihydrofolsäurereduktase blockiert die Bildung von Tetrahydrofolsäure und dadurch indirekt die Bildung von 5 - 10 - Methylen- Tetrahydrofolsäure, wodurch die physiologischen Methylierungsschritte, die für die Purin-de-novo-Synthese und die Bildung von Thymidinmonophosphat erforderlich sind, ausbleiben.
Diese Synthesehemmung von Nukleinsäure-Vorstufen zeichnet MTX als S-Phasen-spezifisches Zytostatikum aus. Daher ist die zytotoxische Wirkung von MTX nicht nur von der applizierten MTX-Dosis, sondern auch von der Dauer zytotoxischer MTX-Konzentrationen im Blut abhängig.

1.2.4 Toxische Wirkungen der Therapie mit MTX

Dem zuletztgesagten zufolge werden auch äußerst hohe MTX-Dosen für eine kurze Zeit gut toleriert. Werden jedoch Plasmakonzentrationen von 10^{-6} M und mehr für länger als 48 Stunden aufrechterhalten, so kommt es zu irreversiblen, toxischen Nebenwirkungen (81, 89).
Der Grund für diese irreversible Schädigung liegt darin, daß - vorher ruhende - Stammzellen des Knochenmarks und des Darmepithels in den Zellzyklus eintreten (Recruitment) und somit für den zytotoxischen Effekt von MTX empfindlich werden.

Die ausgeprägtesten, toxischen Nebenwirkungen von Methotrexat betreffen das Knochenmark, das Darmepithel und die Nieren.
Am raschesten, schon 2 - 4 Tage nach Erstapplikation, macht sich die Schädigung des Gastrointestinaltraktes bemerkbar.
Neben leichten Störungen wie Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoe kann es auch zu ausgeprägteren Schleimhautschäden mit Ulzerationen kommen. Eine Fortsetzung der Behandlung darf erst nach vollständiger Ausheilung der Läsionen erfolgen.
Die durch MTX verursachte Knochenmarkschädigung macht sich meist erst am 7. - 10. Tag im peripheren Blut bemerkbar. Klinisch im Vordergrund steht eine ausgeprägte Granulozytopenie, gleichzeitig werden aber auch eine Thrombozytopenie und eine Anämie beobachtet. Die Normalisierung des Blutbildes tritt etwa zwischen dem 16. und 21. Tag ein (81).
Zu einer toxischen Nierenschädigung kommt es bei niedrigen MTX-Dosen (z.B. 20 mg/m^2 2 x wöchentlich) nur selten.
Erst bei hochdosierter Therapie werden die Nierentubuli geschädigt, so daß eine erhöhte Flüssigkeitszufuhr und Bikarbonatverabreichung erforderlich sind (81).
Das kann sowohl die direkte Schädigung der Tubuluszellen als auch die sekundäre Präzipitation von MTX (oder seines Metaboliten 7-Hydroxymethotrexat) in den Nierentubuli vermindern. Geringfügige, klinisch nicht objektivierbare Schädigungen der Nieren-Tubulus-Zellen können zur verminderten Ausscheidung des Stoffes führen, wodurch bei erneuter Applikation hohe MTX-Spiegel im Blut entstehen. Dies kann dann bei wiederholter Verabreichung zu irreversiblen Nierenschäden führen.

Zu den selten auftretenden Nebenwirkungen müssen die Alopezie und ein - meist juckendes - Hautexanthem gezählt werden. Bei Patienten mit eingeschränkter Leberfunktion sollte die Methotrexatdosierung vermindert werden, da nach langdauernder Anwendung von MTX vereinzelt Leberfibrosen oder Leberzirrhosen beobachtet wurden (81).
Transaminasenerhöhungen nach Methotrexattherapie sind reversibel und müssen nicht zwangsläufig zu einer Dosisverminderung führen.

Nach intrathekaler MTX-Applikation können für einige Stunden Kopfschmerzen, Fieber und Meningismus auftreten. Häufig sind diese Zeichen mit einer Pleozytose verbunden (81).
Besonders nach vorhergehender Schädelbestrahlung (über 20 Gy) kann eine parenterale, hochdosierte MTX-Therapie zu einer nekrotisierenden Leukenzephalopathie mit fortschreitenden, neurologischen Ausfällen führen (81, 89).

1.2.5 Therapieformen

In den letzten 10 Jahren haben sich die Möglichkeiten, MTX klinisch erfolgreich anzuwenden, enorm vergrößert. Ganz wesentlich ist dies auf das bessere Verständnis der pharmakologischen Eigenschaften von MTX zurückzuführen.
Heute werden im wesentlichen zur systemischen Methotrexattherapie drei Behandlungsformen unterschieden :
Die niedrig dosierte MTX-Behandlung wird peroral oder i.v. 1 - 2 x pro Woche fortlaufend durchgeführt.

(Dosierung bis max. 50 mg/m² einmal wöchentlich oder 15 - 20 mg/m² 1 - 2 x wöchentlich).
Bei höherer Dosierung (50 - 150 mg/m²) sind therapiefreie Intervalle von 2 - 3 Wochen bis zur Regeneration erforderlich.
Für die "mittelhohe" MTX-Behandlung werden Dosierungen bis zu 1,5 g/m² Körperoberfläche, für die "hohe" MTX-Therapie bis zu 12 g/m² KO verabreicht.

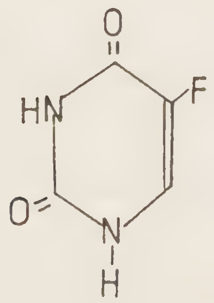
1.3 5 - Fluorouracil = 5-FU

Innerhalb der großen Gruppe der Antimetaboliten haben die Pyrimidinantagonisten inzwischen einen festen Platz eingenommen.
Die in der Klinik am häufigsten angewandten Vertreter dieser Stoffgruppe sind das Cytosin-Arabinosid und das 5 - Fluorouracil = 5-FU.

1.3.1 Indikationsbereiche für 5 - Fluorouracil

5-FU gehört zu den wirkungsvollsten Zytostatika in der Behandlung der Adenokarzinome des Gastrointestinaltraktes und des Mammakarzinoms.
Befriedigende Ergebnisse wurden auch von der Behandlung des Hepatoms, des Ovarial-, Zervix-, Harnblasen-, Prostata-, Pankreaskarzinoms und der Tumoren des Oropharyngealbereiches berichtet. 5 - Fluorouracil wird auch in der Behandlung von Präkanzerosen der Haut, wie der prämalignen Hyperkeratose und bei sog. semimalignen Geschwülsten, wie dem superfiziell-spreitenden Basalzellkarzinom, eingesetzt (39).

Abb. 9 : Chemische Strukturformel für 5-FU



1.3.2 Pharmakokinetik und Metabolismus von 5-FU

1.3.2.1 Resorption, Verteilung und Ausscheidung von 5-FU

5 - Fluorouracil wird gerne i. v. gegeben, da es nach oraler Gabe nur unterschiedlich gut resorbiert wird.

Einer schnellen, intravenösen Verabreichung von 5-FU entsprechen Plasmakonzentrationen von 0,1 bis 1,0 mM. Die Plasmaclearance erfolgt schnell ($t_{1/2}$ = 10 - 20 Minuten), wohingegen die Ausscheidung über die Nieren nach einmaliger i.v.-Injektion innerhalb 24 Stunden lediglich einen Wert von 11 % erreicht. Während dieser Zeit erfolgt jedoch eine Abatmung in Form von CO_2 von 63 % der Radioaktivität (39).
Bei kontinuierlicher Dauerinfusion von 5-FU über 24 Stunden werden Plasmakonzentrationen von 0,5 bis 1,5 mM erreicht, die Ausscheidung über die Nieren innerhalb von 24 Stunden erfolgt nur zu 4 %, währenddessen die Abatmung von $^{14}CO_2$ auf 90 % ansteigt.
5-FU verteilt sich ebenso im Liquor, wobei nach i.v.-Applikation Konzentrationen von 7 M innerhalb von 30 Minuten erreicht und über 3 Stunden aufrechterhalten werden können (39).
Die Verstoffwechselung von 5-FU erfolgt überwiegend in der Leber.

1.3.2.2 Wechselwirkungen von 5-FU mit anderen Pharmaka

Toxische Nebenwirkungen der Therapie mit 5-FU, speziell die Stomatitis, die Einwirkung auf das Darmepithel und die Knochenmarksdepression im Sinne einer Leukopenie, können in der kombinierten Verabreichung mit Allopurinol gemindert werden, bzw. die Konzentration an verabreichtem 5-FU kann in dieser Verbindung gesteigert werden.

Untersuchungen von Howell et al. (49) zeigten, daß die gemeinsame Gabe von 5-FU mit Allopurinol im Vergleich zur alleinigen Verabreichung von 5-FU eine Verdopplung der eingesetzten 5-FU - Konzentration erlaubte, ehe die limitierende Schädigung an Mucosa und Knochenmark einsetzt.

In der Relation Konzentration x Expositionsdauer führt die kontinuierliche Allopurinol-Gabe sogar zu Plasmakonzentrationen,die ein Vierfaches der tolerierten Werte ohne Allopurinol darstellen (49).

Biochemische Grundlage dieser Interaktion ist die allopurinolbedingte Hemmung des Enzyms Orotidyldecarboxylase (ODCase), das Orotidin-5´- Monophosphat (=OMP) in Uridinmonophosphat im letzten Schritt der Pyrimidin-de-novo-Synthese überführt. Hemmung dieses Enzyms führt zur Anhäufung von Orotsäure, welche sich wiederum kompetitiv mit Fluorouracil bezüglich des Enzyms Orotatphosphoribosyltransferase (=OPRTase) verhält.
Über dieses Enzym wird die Umwandlung von Fluorouracil in die Wirkform Fluordesoxyuridinmonophosphat katalysiert, vornehmlich in normalen Zellkulturen.

Ein zweiter Weg, der Metabolisierung von Fluorouracil in seine wirksame Form, der in malignen Zellpopulationen vorherrscht, bedarf der Enzyme Uridinphosphorylase bzw. -kinase.

Das durch Allopurinol erhöhte Angebot an Orotsäure kann in ausreichend hoher Konzentration die Orotatphosphoribosyltransferase vollständig für ihren Metabolisierungseffekt an Fluorouracil hemmen, so daß lediglich über den Uridinphosphorylase-kinase-Weg Fluorouracil in seine toxische Form überführt werden kann. Da in malignen Zellkulturen dieser Schritt vorherrschend bzw. die Aktivität dieses Enzyms erhöht zu sein scheint, bleibt im Tumorbereich zur therapeutischen Nutzung ausreichend Restaktivität erhalten, ohne im gleichen Maß gesunde Zellen zu schädigen, die über die allopurinolbedingten OPRTase-Hemmung vor der aktiven 5-FU-Form geschützt werden (49).

Gleichsinnig wie der Zusatz von Allopurinol während der Therapie mit 5-FU wirkt auch die kombinierte Verabreichung von Leucovorin = Citrovorumfaktor = Folinsäure = Formyl-Tetrahydrofolsäure mit dem Pyrimidinantagonisten. Auch in diesem Fall wird die therapeutische Nutzbarkeit des 5-FU erhöht (49).

1.3.3 Wirkungsmechanismus von 5 - Fluorouracil

Pyrimidinanaloge hemmen weniger die Pyrimidinbiosynthese als vielmehr den Stoffwechsel dieser Substanzklasse im Rahmen der DNS-Biosynthese und haben wegen ihrer darauf beruhenden Antitumorwirkung Verbreitung gefunden.

Die Einfügung eines Fluors am C-Atom 5 des Uracils (5-FU) führt zu einer Verbindung, die die Methylierung an dieser Stelle und damit die Thymidinbiosynthese hemmt.
Damit ist ein wichtiger Schritt der DNS-Synthese gestört. Auch der Einbau von Uracil in die RNS wird gehemmt. Beide Vorgänge sind allerdings reversibel, was man sich zur "Synchronisation" der Tumorzellen zunutze machen kann (39).

Ein Schema der Wirkungsweise von 5-FU bei der Thymidinbiosynthese kann der Abbildung 7 S. 21 entnommen werden.

1.3.4 Toxische Wirkungen der Therapie mit 5-FU

Die frühesten Nebenwirkungen sind Übelkeit und Erbrechen.
Wenn Stomatitis und Diarrhoe auftreten, muß die Substanz bis zum Abklingen der Symptome abgesetzt werden.
Am 10. - 12. Tag kann bereits eine Knochenmarksdepression auftreten, wobei die Leukopenie meist schwerer als die Thrombozytopenie ist.
Cerebelläre Störungen, Haarausfall, Nagelveränderungen, Dermatitis und verstärkte Hautpigmentierung sind seltenere Nebenwirkungen der Therapie mit 5-FU (39).

1.3.5 Therapieformen

Als Dosisempfehlung für den Durchschnittspatienten in gutem Ernährungszustand und ohne Störung der hämatopoetischen, renalen und hepatischen Funktionen gilt bei Bolusverabreichung 12 mg/kg KG pro Tag für

4 Tage und 6 mg/kg KG in 2 - 4 Dosen für die folgenden Tage, sofern keine toxischen Erscheinungen beobachtet werden. Die tägl. Maximaldosis wurde auf 800 mg bei mehrtägiger Gabe schätzungsweise festgelegt (39). Sie wird bei einmaliger Verabreichung in wöchentlichen Abständen auf max. 1000 mg begrenzt.

1.4 Zielsetzung

Ziel der im Folgenden aufgeführten Versuche war

a) die Ermittlung der Wirkschwellenkonzentration für MNCI bei einer in unserem Labor gezüchteten Lymphoblastenkultur " LS_2 " und

b) die Suche nach einer wirksamen Kombination von MNCI mit Methotrexat in einer ersten Versuchsreihe und MNCI mit 5 - Fluorouracil in einer zweiten Versuchsreihe, wobei alle Substanzen in einer Konzentration eingesetzt werden sollten, die unter ihrer Wirkschwellendosis gelegen war. Das erwünschte Resultat war die Dosisreduktion von Zytostatika mittels Kombination von sich ergänzenden oder sich potenzierenden Stoffen (= sog. Sensitizern),

c) die vergleichende Betrachtung der Wirkung äquimolarer Konzentrationen von Azathioprin und 6-Mercaptopurin und die Schlußfolgerung daraus, ob 6-MP im Metabolismus von AZA in äquimolarem (äquitoxischem) Verhältnis entsteht oder nicht.

2 Material und Methoden

2.1 Zellen

Als Modell-Zellen dienten permanent wachsende menschliche Lymphoblastenkulturen, die in unserem Labor etabliert wurden :

LS_2 - Kultur = undifferenzierte Lymphoblasten

2.2 Zellzüchtung

2.2.1 Auftauen der eingefrorenen Zellsuspensionen

Die bei -80° C gelagerten Zellen, die sich in Einmal-Plastikröhrchen befanden, wurden einige Stunden in einem Ständer aufbewahrt, damit sie sich allmählich der Raumtemperatur anpassen konnten. Währenddessen wurde das Nährmedium für die Suspension vorbereitet. Hierzu wurden, wie in allen weiteren Teilungs- und Versuchsansätzen, 80 % Medium und 20 % fetales Kälberserum (FCS), beides in 2.2.2 näher beschrieben, verwendet.

Die 4 ml Zellsuspension, enthalten in jedem Plastikröhrchen, wurde vorsichtig aufgeschüttelt und in eine Kulturflasche der Firma Nunclon Delta SI, Nunc 80CMZ/260ML gegeben. Hinzugefügt wurde das o.g. Medium/FCS-Gemisch, bis die 50 ml Marke der verwendeten Kulturflasche erreicht war. Dadurch wurde eine liegende Kultivierung im Brutschrank ermöglicht.

Jeder der hier genannten Arbeitsschritte wurde an einem sterilen Arbeitsplatz unter sterilen Bedingungen, wie in 2.2.3 näher erläutert, ausgeführt.

2.2.2 Nährbedingungen

Als Medium diente RPMI 1640 Medium der Firma Seromed in folgender Zusammensetzung :

Gepufferte Salzlösung	mg/l
NaCL	6000
KCl	400
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	100
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4\ H_2O$	100
$Na_2HPO_4 \cdot 7\ H_2O$	1512
Glucose	2000
$NaHCO_3$	2000

Aminosäuren	
L-Arginin	200
L-Asparagin	50
L-Asparaginsäure	20
L-Cystin	50
L-Glutaminsäure	20
Glycin	10
L-Histidin	15
L-Hydroxyprolin	20
L-Isoleucin	50
L-Leucin	50
L-Lysin, HCl	40
L-Methionin	15
L-Phenylalanin	15

L-Prolin	20
L-Serin	30
L-Threonin	20
L-Tryptophan	5
L-Tyrosin	20
L-Valin	20

Vitamine	mg/l
p-Aminobenzoesäure	1
Biotin	0,2
D-Ca-Pantothenat	0,25
Cholinchlorid	3
Folsäure	1
L-Inositol	35
Nicotinamid	1
Pyridoxin	1
Riboflavin	0,02
Thiamin HCl	1
Cyanocobalamin	0,005

Andere Bestandteile	
Glutathion reduziert	1
Phenolrot	5

Jede 500 ml-Medium-Flasche wurde mit 5 ml Penicillin-Streptomycin (PS), 10.000 I.U./ml Penicillin und 10.000 mcg/ml Streptomycin, sowie 6,8 ml L-Glutamin (L-Glu), 200 mM substituiert. Dazu wurden die in 50 ml-Flaschen tiefgefrorenen Substanzen bei Raumtemperatur aufgetaut. Die nachgenannten Arbeitsvorgänge erfolgten an einem Arbeitsplatz, der während

der Benutzung unter keimfreier Luftumwälzung ("laminar-air-flow") und in der Zwischenzeit unter UV-Bestrahlung stand.

Das Einbringen der o. g. Substituenten in die Mediumflasche erfolgte mittels steriler Einmal-Kunststoff-Pipetten bzw. sterilisierter Glaspipetten, die mittels eines Vakuum-Aufsatzes bis zur benötigten Marke aufgezogen wurden. Jegliche Berührung der Pipetten mit den Flaschenhälsen wurde vermieden, nach dem Öffnen und vor dem Schließen der Flaschen wurden trotzdem sowohl Flaschenhälse als auch die mit Stanniol überzogenen Deckel an einem Bunsenbrenner abgeflammt, um mögliche Kontaminationen weitestgehend auszuschalten. Auch der Deckel der fertiggestellten Medium-Flasche wurde mit einem abgeflammten Stanniolquadrat überzogen, die Flasche selbst bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt.
PS und L-Glu wurden erneut tiefgefroren.

Als zweite Substanz der Nährlösung diente fetales Kälberserum (FCS) der Firma Seromed, Art.Nr. S0112, mykoplasmengetestet.

Aufbereitet wurde die 500 ml Originalflasche, indem sie bei 56° C 40 Minuten lang im Wasserbad inaktiviert und anschließend in sterile Glasflaschen zu je 100 ml abgefüllt wurde. Die Gebrauchsflasche wurde bei 4° C aufbewahrt, die restlichen Flaschen bei -20° C gelagert.

Als Wachstumsmilieu für die Kulturflaschen diente ein Brutschrank der Firma Heraeus, Typ KB 500-K-CO_2, eingestellt auf eine Temperatur von 37° C. Die Atmosphäre wurde mit 5 % CO_2 angereichert. Der Brutschrank wurde mit 2 l pro Minute des Luft/CO_2-Gemisches durchströmt. Als Luftbefeuchter dienten zwei in den Brutschrank eingebrachte Glasschalen mit einer Natrium-Azid-Lösung.

2.2.3 Kulturteilung

In früheren Versuchen hatte sich ein 2- bzw. 3-tägiger Teilungsrhythmus für das Wachstum der Zellen als besonders günstig erwiesen. Damit ergaben sich die Teilungstermine Montag, Mittwoch und Freitag.

Geteilt wurde am sterilen Arbeitsplatz. Für jede zu teilende Kulturflasche wurde je eine neue mit Teilungsdatum und -nummer beschriftet, sowie mit Markierungen bei 25 und 50 ml versehen. Entsprechend der erforderlichen Menge, für jede Flasche 25 ml, wurde Medium und FCS im Verhältnis 5:1 in einen sterilen Meßzylinder gegeben. Zur besseren Durchmischung erfolgte ein Umgießen in einen sterilen Meßbecher.

Durch vorsichtiges Schwenken wurde eine homogene Verteilung der Zellen in der zu teilenden Flasche erreicht. Nach Abschrauben der Deckel erfolgte ohne Berührung der Flaschenhälse ein Umgießen von 25 ml der alten in die neue Kulturflasche. Die nun in jeder Flasche verbleibenden 25 ml wurden bis zur 50 ml-Marke mit dem Nährgemisch aufgefüllt.

Jedes Hantieren mit Flaschen, Deckeln oder Gefäßen wurde von einem Abflammen im Bunsenbrenner begleitet. Die auf diese Weise angesetzten neuen Kulturen wurden wieder in den Brutschrank gegeben. Um einen Gasaustausch zu gewährleisten wurden die Deckel nur lose aufgesetzt.

Alte unbenötigte Kulturen wurden zur Abtötung der Zellen mit einigen Millilitern 35-37 %iger Formaldehydlösung versetzt und nach 24 Std. weggeschüttet.

2.2.4 Tiefgefrieren der Zellkulturen

Zum Zwecke der Vorratshaltung erwies es sich als sinnvoll, gut wachsende Zellpopulationen einzufrieren.

Dazu wurde eine Kultur nach einem 48-Std.-Wachstum in ein 50 ml fassendes steriles Zentrifugenröhrchen umgegossen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation über 5 min. bei 1000 U/min. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen.

Zur Resuspendierung des Zellsedimentes wurde ein 6%iges DMSO-Medium (Dimethylsulfoxid) hergestellt.

Die folgende, für die Tiefgefrierung von 4 Kulturen ausreichende Lösung mag als Beispiel dienen :

16 ml RPMI-Medium und 4 ml FCS wurden mit DMSO der Firma Merck, Art.9678, Konzentration 99 %, versetzt und steril filtriert (s. 2.7.5). Nach Durchmischung erfolgte Abpipettierung von jeweils 4 ml des DMSO-Mediums und dessen Zugabe zu einer Zellsuspension.

Nach sorgfältiger Durchmischung erfolgte Umfüllung in sterile 5 ml-Kunststoffröhrchen. Nach einer Lagerung von 30 Min. im Kühlschrank wurden die Röhrchen bei -80° C eingefroren.

Alle aufgeführten Arbeitsgänge erfolgten unter Beachtung der vorher beschriebenen sterilen Arbeitsweise.

2.3 Zellzählung

Zur Zählung der Zellen wurde ca. 1 ml der Kultur in ein Eppendorf-Gefäß abgefüllt. in ein weiteres Eppendorf-Gefäß wurden jeweils 50 µl der Zellsuspension sowie 50 µl des Farbstoffes Trypanblau (0,5 g in 100 ml aqua dest.) mittels einer Eppendorf-Pipette eingebracht. Um eine Penetration des Farbstoffes durch geschädigte Zellmembranen zu gewährleisten, erfolgte die Auszählung erst nach 10 min Durchmischungszeit. Ein Tropfen der Zell-Farbstoff-Suspension wurde in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht und unter dem Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung ausgezählt. Eine Trennung von lebenden und toten Zellen ist möglich, da die Membranen von geschädigten Zellen für Trypanblau durchlässig sind. Die Zählung erfolgte mittels manuell betriebener mechanischer Zähluhren. Es wurden 4 Eckquadrate mit jeweils 16 Feldern ausgezählt. Die ermittelten Werte wurden mit dem Faktor 5 multipliziert, woraus sich die Lymphoblastenzahlen pro µl ergaben.

2.4 Zellfärbung

Zur Zellfärbung wurden Eppendorf-Gefäße mit ca. 2 ml Zellsuspension gefüllt und in einer Eppendorf-Zentrifuge bei 12.000 U/min für einige Sekunden kurz anzentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen; jeweils 5µl des Zellsediments wurden auf einen Objektträger gebracht und ausgestrichen.

Es schloß sich die Färbung nach Pappenheim an.

Dazu benötigtes Material :

May-Grünwald-Lösung (Merck-Art.-Nr. 1424) unverdünnt
Giemsa Lösung (Merck-Art.-Nr. 9204), 3 ml ad 100 ml gepuffertes Aqua bidest.

Gepuffertes Aqua bidest., pH 7,2
Ansatz für 1 l : 1,14 g Dinatriumhydrogenphosphat (Merck-Art.-Nr. 6586) und 0,49 g Kaliumdihydrogenphosphat (Merck-Art.-Nr. -4873) wurden dem Aqua bidest. zugesetzt und in einem Kolben mittels Rührkern gelöst.

Färbevorgang :

Die Objektträger wurden 6 min in eine Glasfärbeschale mit vorher durchfiltrierter May-Grünwald-Lösung gestellt. Anschließend wurde die o.g. Pufferlösung zum Abspülen der Objektträger benutzt, welche dann für 20 min in eine zweite Glasfärbeschale mit durchfiltrierter verdünnter Giemsalösung gebracht wurden. Nach Beendigung des Färbevorgangs erfolgte die erneute Abspülung mit gepuffertem Aqua bidest. und die Präparate wurden zum

Trocknen aufgestellt. Die Betrachtung der gefärbten Präparate erfolgte in Öl-Immersion unter dem Licht-Mikroskop der Firma Zeiss, 473011/9901, bei 800-facher Vergrößerung.

2.5 Einstellung der Zellzahlen im Versuchsansatz

Als Ausgangsniveau für die LS_2-Kultur wurden Zellzahlen von ca. 1000/µl angestrebt.

Dazu wurden zunächst die Zellzahlen in den vorliegenden Kulturflaschen (Versuchsansatz jeweils Montags, also einer 3-tägigen Anzüchtung entsprechend) bestimmt. Die Ausrechnung des benötigten Zellsuspensions-Volumens erfolgte nach folgender Formel :

Vorhandene Zellen pro µl x Volumen (gesucht) entspricht gewünschter Zellzahl x Volumen (50 ml)

Daraus ergibt sich :

$$\text{Volumen (gesucht)} = \frac{1000 \times 50\ \text{ml}}{\text{gezählte Zellen}}$$

Dem so errechneten Zellsuspensionsvolumen wurde soviel Medium/FCS-Gemisch, wiederum im Verhältnis 5:1, zugesetzt, daß das Gesamtvolumen in jeder angesetzten Versuchsflasche 50 ml ergab.

Zur Überprüfung der tatsächlich erhaltenen Zellzahl wurde der Zellgehalt der Kulturflasche - wie unter 2.3 beschrieben - bestimmt.
Diese Zellzahl wurde als Bezugspunkt für die Bewertung des Kulturwachstums verwendet.

2.6 Testsubstanzen

In den Versuchen wurden folgende Testsubstanzen verwendet :

Azathioprin der Fa. Wellcome, Molekulargewicht 277,29

6-Mercaptopurin der Fa. Wellcome, Molekulargewicht 152,19

Methotrexat der Fa. Medac GmbH, Molekulargewicht 454,46

5-Fluorouracil der Fa. Farmitalia, Carlo Erba GmbH, Molekulargewicht 103,08

I_1 = 1-Methyl-5-Chlor-Imidazol*, Molekulargewicht 116,55.

I_2 = 1-Methyl-4-Nitro-5-Chlor-Imidazol*, Molekulargewicht 161,55

I_3 = 1-Methyl-4-Nitro-5-Thio-Imidazol*, Molekulargewicht 159,17.

* Die drei Imidazolderivate wurden synthetisiert und gereinigt von Dr. H.J. Zeitler, Institut für Klinische Hämatologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH, München.
Ihm soll an dieser Stelle für die Überlassung der Präparationen gedankt werden.

2.7 Herstellung der Testlösungen

2.7.1 Herstellung des Lösungsmittels

Zur Herstellung eines 0,05 M Kaliumbicarbonats wurden 0.5 g $KHCO_3$ (Merck-Art.-Nr. 4854) in 100 ml Aqua bidest. gelöst. Die Aufbewahrung dieses Lösungsmittels erfolgte bei 4° C im Kühlschrank.

Für die Lösung der Substanzen wurden jeweils pro anzusetzende Versuchsflasche 3 ml des o.g. Lösungsmittels mit 50 µl 1 N NaOH (Natronlauge) versetzt.

2.7.2 Auswiegen der festen Substanzen

Die Auswägung der Substanzen erfolgte auf der Analysenwaage Mettler, H54AR/9, BJ 77, Max = 160 g, d = 0,01 mg.

Es wurden Mengen ausgewogen die Konzentrationen entsprachen, welche um zwei Zehnerpotenzen über den in den Versuchsflaschen erwünschten Endkonzentrationen lagen. Die Begründung hierfür ist aus folgendem Beispiel zu entnehmen.

In der Versuchsflasche wird eine Konzentration von 10^{-6} M gewünscht. Die Substanz wird entsprechend einer Konzentration von 3×10^{-4} ausgewogen. Nach Zugabe von 3 ml Lösungsmittel bleibt eine Konzentration von 10^{-4}M. Davon erfolgt der Zusatz von 0,5 ml in die 50 ml Kulturflasche, wodurch sich ein Verdünnungseffekt um den Faktor 100 ergibt. Damit ist die gewünschte Endkonzentration von 10^{-6} erreicht.

Zur Eliminierung der Eigengewichte der als Wägebehälter dienenden Eppendorf-Gefäße wurde der 0-Punkt der Waage auf deren Leergewicht austariert. Aufgrund minimaler Gewichtsdifferenzen mußte dies für jedes verwendete Eppendorf-Gefäß erneut erfolgen.

2.7.3 Pipettieren der flüssigen Substanz

Das flüssig vorliegende Imidazolpräparat I_1 mußte mit einer Hamilton-Bonoduz, Mikroliter Syringe-Pipette entsprechend der gewünschten Molarität aufgezogen werden.

2.7.4 Auflösen der Substanzen in $KHCO_3$/NaOH

Jedem Eppendorf-Gefäß mit der ausgewogenen Substanz wurde zunächst 1 ml $KHCO_3$ zugesetzt und der Inhalt in ein 5 ml Kunststoffröhrchen umpipettiert. Zur Vermeidung von Rückständen wurde das Eppendorfgefäß zwei weitere Male mit jeweils 1 ml $KHCO_3$ gespült, der Inhalt anschließend ebenfalls umpipettiert. Die Lösungsmittelmenge von 3 ml wurde gewählt, um nach Volumenverlusten durch die Filtration von ca. 1 ml mit etwa 2 ml noch eine ausreichende Menge Substanzlösung zu haben und um eventuelle Wechselwirkungen der gelösten Substanz mit den Wänden der Plastikröhrchen möglichst klein zu halten. Zu der sich nun in 3 ml $KHCO_3$ befindlichen Substanz wurden 50 µl 1 N NaOH zugegeben, da aus früheren Versuchen bekannt war, daß ein basischer pH die Löslichkeit der Substanzen verbessert. Da sich einige Substanzen, insbesondere Azathioprin, als schwer löslich erwiesen, wurden die

Plastikröhrchen ca. 10 min. bei 37° C im Wasserbad gehalten. Zwischenzeitlich erfolgte mehrmals eine Durchmischung auf dem Rüttler.

2.7.5 Sterile Filtration

Jede in 3 ml $KHCO_3$/NaOH gelöste Substanz mußte vor ihrer weiteren Verwendung steril filtriert werden. Sterile Filter der Firma Millipore, Miltex-GS, kamen zur Anwendung. Mittels einer Eppendorf-Pipette wurde der Inhalt der Plastikröhrchen in eine 4 ml fassende sterile Einweg-Spritze eingebracht. Die Spritze selbst wurde dem noch in der Verpackung befindlichen sterilen Filter aufgesetzt, um diesen ohne Zuhilfenahme der Hände entnehmen zu können. Die Filtration erfolgte in sterile, kurz zuvor der Verpackung entnommene Plastikröhrchen. Der Rückstand von mindestens 1 ml Lösungsmittel im Filter war der jetzt offensichtliche Grund für die Verwendung von 3 ml Lösungsmittel, wenn 2 ml für die Versuchsdurchführung benötigt wurden (≙ 4 Flaschen).

2.7.6 Herstellung der Verdünnungsreihen für Methotrexat und 5-Fluorouracil

Um einen eventuellen chemosensibilisierenden Effekt von MNCI auf die Wirkung von MTX und 5-FU untersuchen zu können, war es nötig, für MTX und 5-FU eine Verdünnung zu finden, die ihrer gerade unwirksamen Konzentration entsprach. In dieser sollten die Zytostatika dem Zellsuspension/Imidazolgemisch zugesetzt werden.
Für MTX wurde folgende Verdünnungsreihe festgesetzt :
Das im Gefrierschrank befindliche MTX (5 mg bei -20° C) wurde mit 1 ml Aqua bidest gelöst, wodurch eine 10^{-2}M-Lösung entstand.

Durch Abnahme von jeweils 100 µl der Lösung mittels 100 µl-Pipette in ein Eppendorfgefäß und Zusatz von 900 µl Aqua bidest erfolgte die Verdünnung um jeweils eine Zehnerpotenz.
Der Vorgang wurde dreimal durchgeführt, so daß MTX schließlich in einer Konzentration von 10^{-5}M vorlag. Der letzte Verdünnungsschritt von 10^{-4}M auf 10^{-5}M wurde 3-fach wiederholt, um drei 1-ml-Eppendorfgefäße mit einer 10^{-5}M MTX-Lösung zu erhalten. Damit war die benötigte Menge für die jeweilige Versuchsreihe hergestellt.

Im Test konnte durch Zusatz von 0,5 ml der MTX-Lösung zu 50 ml Zellsuspension die Verdünnung auf 10^{-7}M fortgeführt werden und durch Variation der Menge des Zusatzes diese vorgegebene Konzentration weiter verringert oder bei Bedarf erhöht werden; z. B. nur 0,250 ml der 10^{-5}M Lösung in 50 ml Zellsuspension ergab dann 5×10^{-8}M MTX-Konzentration.

In derselben Weise wurde mit 5-Fluorouracil verfahren.

5-FU lag in 10^{-1}M Konzentration vor und konnte auf die angegebene Art durch zweimaliges Verdünnen auf 10^{-3}M eingestellt werden.
Auch hier wurden 3 Eppendorfgefäße à 1 ml mit der Konzentration 10^{-3}M gefüllt, um den benötigten Mengen gerecht zu werden.
Im Test konnte dann durch Zusatz von beispielsweise 0,025 ml der 10^{-3}M 5-FU Lösung zu 50 ml Zellsuspension eine 5×10^{-7}M Konzentration erreicht und durch Variation dieser zuzusetzenden Menge auch hier die Konzentration entsprechend verändert werden; z. B. 0,050 ml der 10^{-3}M 5-FU Lösung ergaben in 50 ml Zellsuspension dann eine Konzentration von 10^{-6}M.

2.8 Pipettieren der Substanzen in die Kulturflaschen

Den Eppendorf-Pipetten wurden einzeln verpackte sterile Spitzen aufgesetzt und damit je 0,5 ml der steril filtrierten Substanz-Lösung aufgezogen. Die Kulturflaschen wurden geöffnet und abgeflammt. Der Substanzzusatz erfolgte ohne Berührung des Flaschenhalses. Anschließend wurden die Kulturflaschen wiederum abgeflammt, verschlossen, mittels vorsichtigem Schwenken durchmischt und in den Brutschrank gelegt. Eine Probenentnahme erfolgte täglich, eine Teilung der Versuchskulturen wurde für die Dauer des Versuches (Montag bis einschließlich Freitag) nicht durchgeführt.

2.9 Verwendetes Arbeitsmaterial

2.9.1 Sterile Gefäße

Die Sterilisation der verwendeten Bechergläser und Meßzylinder erfolgte in unserem Labor in einem Autoklaven der Firma M, Ehrent GmbH, Typ TK 2, Nr. 6942. Dazu wurden die Öffnungen der gewaschenen und getrockneten Gefäße mit Stanniolpapier verschlossen, wobei darauf zu achten war, daß insbesondere an den Rändern bzw. Ausgüssen keine Falten entstanden. Sterilisiert wurde für die Dauer von 12 Std. bei 210° C. Eine Öffnung der Gefäße erfolgte nur am sterilen Arbeitsplatz, unmittelbar vor Gebrauch.

2.9.2 Sterile Pipettenspitzen und Eppendorf-Gefäße

Zur Sterilisation wurden Pipettenspitzen und Eppendorf-Gefäße in Stericlin-Gas-Papierhüllen eingebracht, die Ränder beidseitig verschweißt und bei 120° C für 45 min dampf-sterilisiert.

3 Ergebnisse

3.1 Konzentrationsabhängigkeit der MNCI-Wirkung

Die Konzentrationsabhängigkeit des zytotoxischen Effektes von MNCI wurde im Bereich 10^{-5} bis 10^{-4} an undifferenzierten menschlichen Lymphoblastenkulturen (LS_2-Zellen) untersucht.
Dieser Bereich wurde gewählt, weil er in vorausgegangenen Versuchen bereits als der relevante zwischen völliger Wirkungslosigkeit und massivem zytostatischem/zytotoxischem Effekt erachtet worden war.
Auch eine vermutete Wirkschwelle war bereits in einer Verdünnungsreihe nachgewiesen worden und sollte nun nochmals überprüft und genau definiert werden.

3.1.1 Bezug/Vergleich der Ergebnisse

Eine Kontrollkultur wurde zum Vergleich mitgeführt. Eine identische Menge an Lösungsmittel, auf 3 ml $KHCO_3$ jeweils 50 ul 1N NaOH, wurde während der gesamten Versuchsdauer sowohl der entsprechenden Versuchs- als auch der Kontrollkultur zugesetzt. In bereits vorausgegangenen Vergleichsstudien mit Kontrollen ohne Lösungsmittelzusatz hatte sich das $KHCO_3$ - NaOH - Gemisch als neutral in Bezug auf Wachstum und Sterberate der Zellpopulation erwiesen. Damit konnte die mitgeführte Kontrollkultur als adäquate Vergleichspopulation unter denselben Wachstumsbedingungen dienen.

3.1.2 Darstellung der Ergebnisse

In Abb. 10 sind die sechs Versuchskulturen mit steigender Konzentration von MNCI und die Kontrollkultur in je zwei Säulen dargestellt. Die linke der beiden Säulen gibt die Werte zum Zeitpunkt 0 Stunden, also zur Zeit des Versuchsansatzes vor Zugabe der Substanzen an, die rechte die Werte nach 72 Stunden Wachstum. Zu diesem Zeitpunkt waren die gemessenen Zellzahlen am aussagekräftigsten, da Schwankungen der Ausgangszellzahlen bereinigt und der Kurvenverlauf am Ende der log-Phase gelegen war.

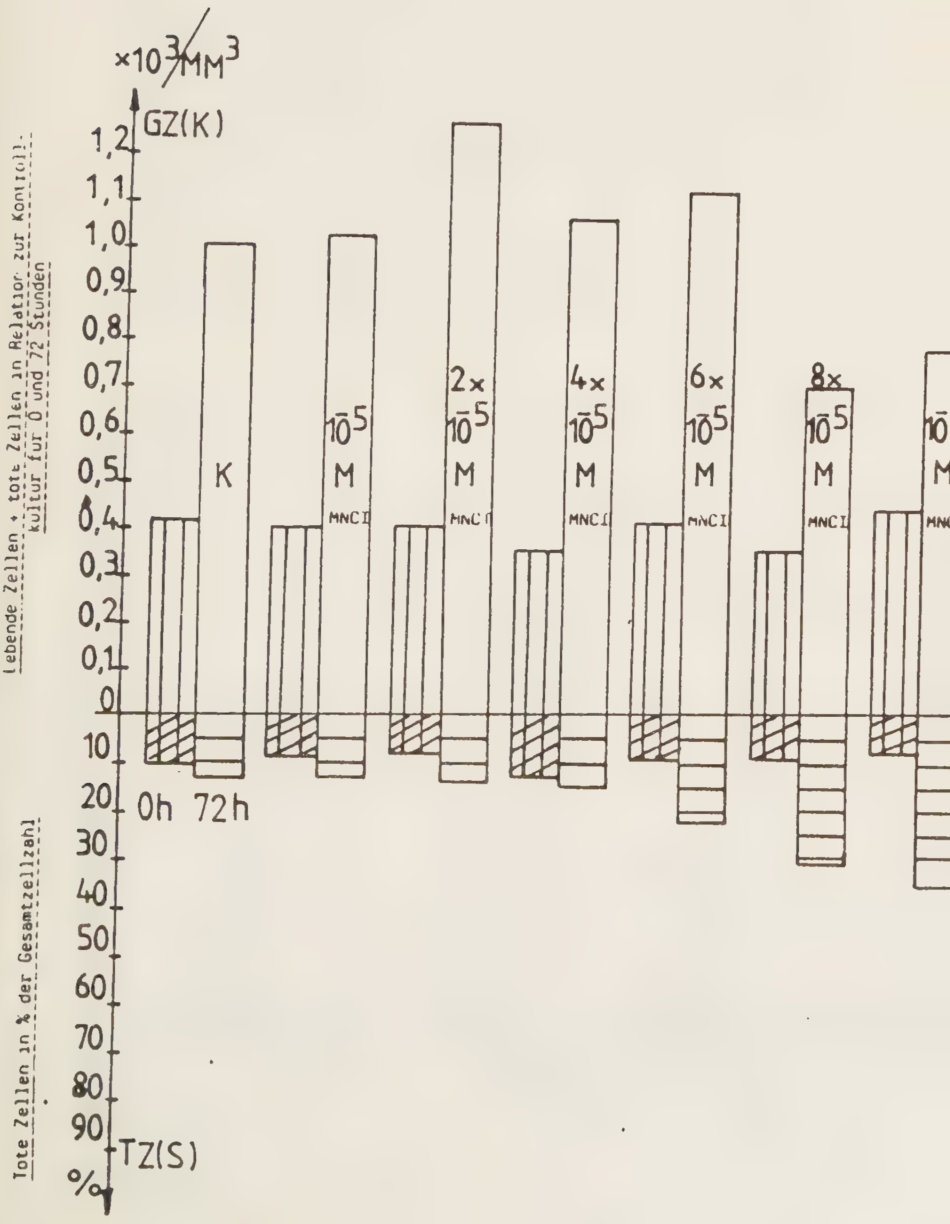
Die Werte der oberen Hälfte der graphischen Darstellungen sind Gesamtzellzahlen im Vergleich zur Kontrolle, deren Wachstumsendergebnis nach 72 Stunden gleich 1 gesetzt wurde, woraus sich bei Umrechnung aller übrigen Gesamtzellzahlen eine Basis zum relativen Vergleich mit der Kontrolle ergab. In der Darstellung werden diese auf die Bezugsgröße 1 ermittelten relativen Gesamtzellzahlen auf der Ordinate mit GZ(K) (=Gesamtzellzahl in Bezug auf die Kontrolle) bezeichnet.

Die Werte der unteren Hälfte der Graphiken geben für jede Kultur zu den entsprechenden Meßzeiten (0 h/72 h) den Anteil der abgestorbenen Zellen in Prozenten der jeweiligen Kulturgesamtzellzahl an. Sie sind also nicht auf die Kontrolle geeicht, sondern geben individuell für jede Kultur mit der zugesetzten Substanz die Zahl der toten Zellen in % wieder. In der Graphik werden sie mit TZ(S) (=Tote Zellen unter Einwirkung der jeweils untersuchten Substanz) benannt.

3.1.3 Beschreibung der Ergebnisse

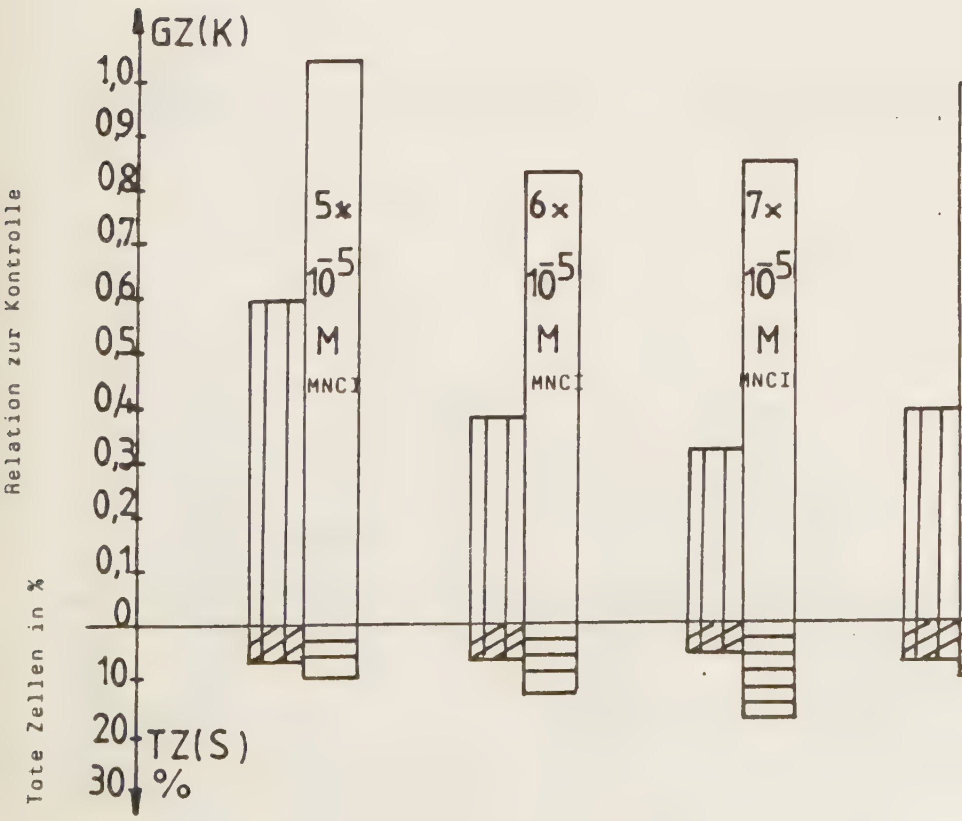
Wie aus Abb. 10 hervorgeht, läßt sich bis einschließlich einer Konzentration von $6x10^{-5}$ M MNCI keine Beeinträchtigung des Wachstums der Zellpopulation nach 72 Stunden feststellen. Die Kultur erreicht einen Gesamtzellwert, der über dem der Kontrolle liegt, obwohl ihr Ausgangswert im Vergleich zur Kontrolle auf gleichem Niveau lag.
Mit der nächsthöheren Konzentration von $8x10^{-5}$ M sinkt das Zellwachstum abrupt auf 0,7 GZ(K) ab und verbleibt auch bei weiterer Erhöhung der Konzentration auf 10^{-4} M in diesem Bereich.
Es muß daher davon ausgegangen werden, daß zwischen den Stufen $6x10^{-5}$ M und $8x10^{-5}$ M MNCI eine Konzentrationsschwelle liegt, deren Überschreitung zu einem deutlichen wachstumshemmenden bzw. zytotoxischen Effekt führt.

Abb. 10 : Wachstum der LS_2-Zellkulturen unter der Verdünnungsreihe für MNCI von 10^{-5} M bis 10^{-4} M



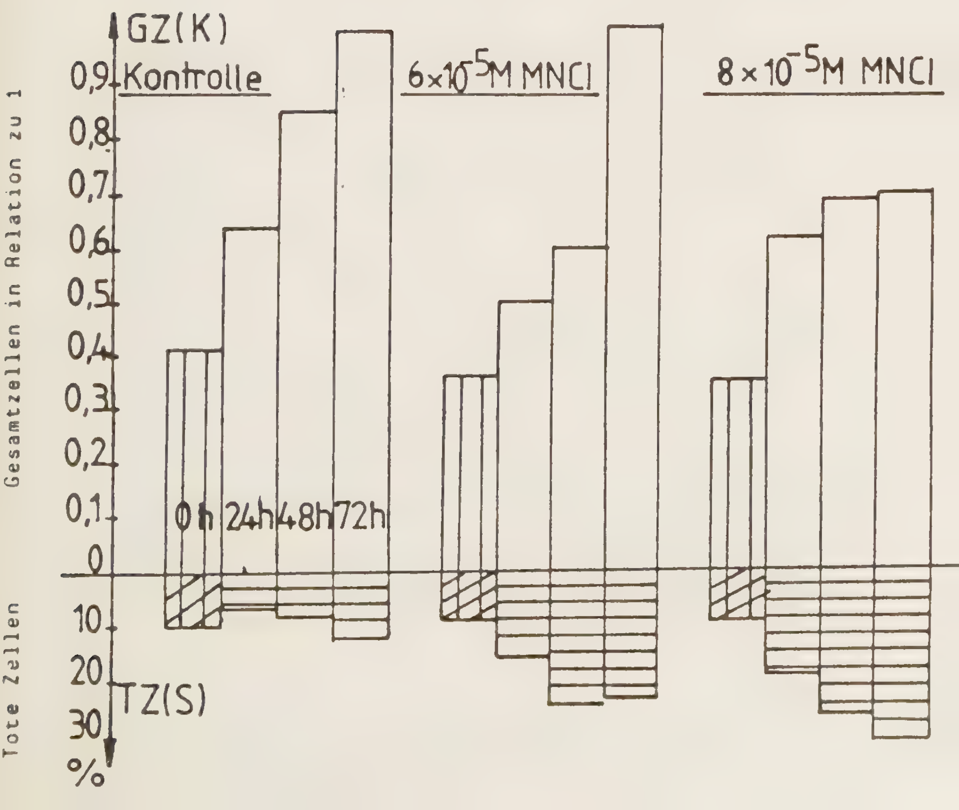
In einem weiteren Versuch wird in Abb. 11 die Zwischenstufe $7x10^{-5}$ M mit den vorangehenden zwei Konzentrationen ($6x10^{-5}$ M und $5x10^{-5}$ M) dargestellt. Auch hier liegt die Endstufe des Wachstums in dem Bereich (> 0,8 GZ(K)), der durch die mitlaufende Kontrolle vorgegeben ist und damit kann eine Hemmwirkung in Bezug auf das Wachstum der Kultur auch noch im Bereich von $7x10^{-5}$ M nicht sicher angenommen werden.
Mit dieser Verdünnungsstufe scheint die Wirkschwelle erreicht zu sein.

Abb. 11 : Darstellung der Zwischenstufen $5x10^{-5}$ M und $7x10^{-5}$ M



Die Änderung im Wachstumsverhalten bei Überschreiten der Schwellenwertkonzentration wird nun in Abb. 12 deutlich. Mitaufgenommen in die Graphik wurden nun auch die Wachstumswerte nach 24 und 48 Stunden. Während bei der Kontrollkultur und der mit 6×10^{-5} M MNCI versetzten Zellreihe ein täglicher, stetiger Wachstumsschub zu verzeichnen ist, kann bei der hohen Konzentration von 8×10^{-5} M MNCI ein Sistieren des Wachstums nach 48 Stunden festgestellt werden.

Abb. 12 : Darstellung des Wachstumsverhaltens von Kontrolle, 6×10^{-5} M und 8×10^{-5} M zum Zeitpkt. 0 - 24 - 48 - 72 - Stunden

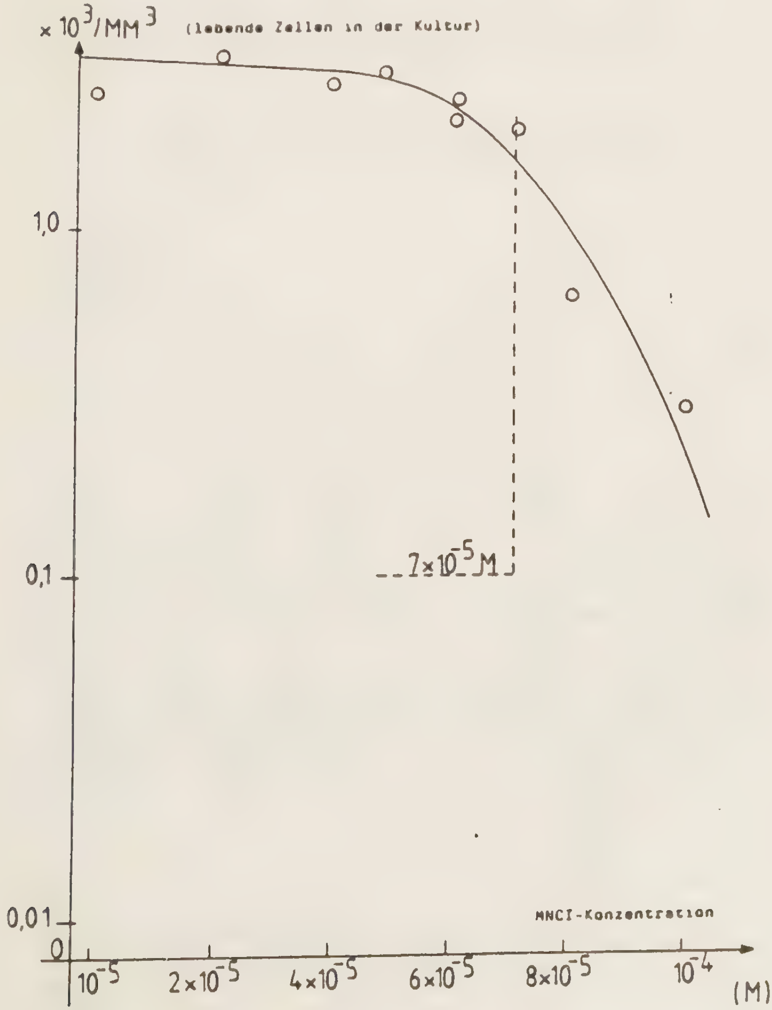


Bei Betrachtung der unteren Hälften der graphischen Darstellungen, also der abgestorbenen Zellen der jeweiligen Kulturflasche, ergibt sich grundsätzlich ein ähnliches Resultat.
In Abb. 10 liegen die Prozentwerte für die toten Zellen für die über der Wirkschwelle liegenden Konzentrationen $8x10^{-5}$ M und 10^{-4} M mit 31 % und 36 % nach 72 Stunden weit über denen der Kontrolle und der Verdünnungsstufen 10^{-5} M, $2x10^{-5}$ M und $4x10^{-5}$ M (12 - 15 %).
Da die Anfangswerte jedoch nicht höher waren, als die der unwirksamen Konzentrationen, kann man hier von einem echten zytotoxischen Effekt des MNCI ausgehen.
In Abb. 10 scheint die Stufe $6x10^{-5}$ M eine besondere Stellung einzunehmen : Hinsichtlich des Wachstums der Zellpopulation unterscheidet sie sich nicht von den übrigen unwirksamen Konzentrationen, hinsichtlich der Absterberate liegt sie jedoch etwas über dem Niveau, das als Normalbereich durch die Kontrolle definiert wird. Da zum Zeitpunkt 0 Stunden keine höhere Ausgangszellzahl zu erkennen ist, kann dies nicht als ursächlich für die erhöhte Anzahl von toten Zellen angesehen werden.
Auch in Abb. 11 und 12 liegt der Prozentsatz der toten Zellen für die Konzentrationen um den Schwellenwert (hier zusätzlich $7x10^{-5}$ M) mit ca. 18 - 24 % bei höheren Werten als bei der Kontrolle und den ersten drei Verdünnungsstufen.
Zusammenfassend ergibt sich aus den Ergebnissen :
Das Imidazolderivat 1-Methyl-4-Nitro-5-Chloro-Imidazol (MNCI) ist in seiner Wirkung konzentrationsabhängig. Der volle wachstumshemmende und zytotoxische Effekt tritt bei einer Konzentration von $8x10^{-5}$ M und darüber

auf. Hinsichtlich der Wachstumsbeeinflussung erfolgt dies sehr plötzlich im Sinne eines Schwellenwerteffekts ab einer Dosis von über 7×10^{-5} M.

Abb. 13 : Darstellung des Wirkschwelleneffektes in Kurvenform unter Berücksichtigung nur der lebenden Zellen.

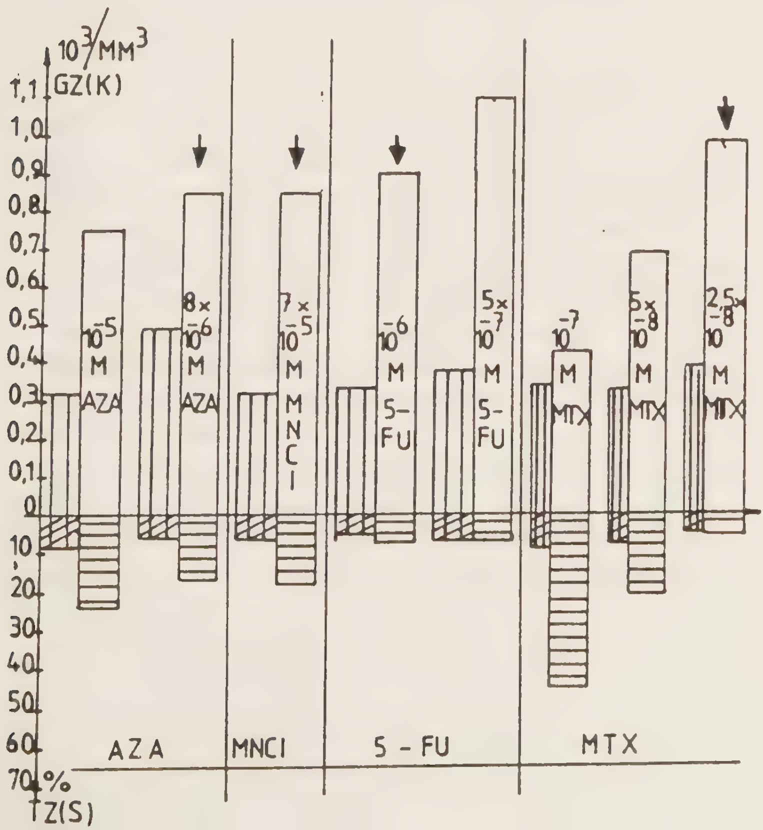
Die Abnahme der lebenden Zellen wird ab einer Konzentration von $>7 \times 10^{-5}$ M deutlich.



3.2 Substanzkombinationen zwischen Azathioprin, MNCI, 5-Fluorouracil und Methotrexat und deren Wirkung auf das Wachstumsverhalten der LS_2-Kulturen

Ziel der Untersuchungen war, für die einzelnen Substanzen solche Konzentrationen zu wählen, die für sich alleine keinen oder nur einen geringen zytostatischen Effekt hatten, um dann die Wirkung bei Kombination der Stoffe miteinander zu untersuchen. Unter diesem Aspekt wurden Versuchsreihen erstellt, deren Zweck darin bestand, zunächst diese unwirksamen Konzentrationen für jede Substanz ausfindig zu machen.

Abb. 14 : Ermittlung der Substanzkonzentrationen



3.2.1 Bezug/Vergleich der Ergebnisse

3.2.2 Darstellung der Ergebnisse

Sowohl für den Bezug/Vergleich, als auch für die Darstellung der Ergebnisse gilt das unter 3.1.1 (Seite 53) bzw. 3.1.2 (Seite 54) Gesagte.

3.2.3 Beschreibung der Ergebnisse

In Abb. 14 sind von links nach rechts die untersuchten Konzentrationsbereiche der Wirkstoffe in Säulenform dargestellt. Die erreichten Endkonzentrationen, die für die späteren Stoffkombinationen die Grundlage lieferten, liegen hier in einem Bereich, für den keine eindeutige zytostatische Wirkung mehr angegeben werden kann (= Markierung mit Pfeilen).
MNCI liegt mit einer Dosierung von $7x10^{-5}$ M genau im Bereich seiner Wirkschwelle und damit in dem Bereich, der das Wachstum noch unbeeinflußt, die Absterberate jedoch bereits geringfügig ansteigend erscheinen läßt. (18,8 % tote Zellen nach 72 Stunden)

Azathioprin ist mit einer Konzentration von $8x10^{-6}$ M hinsichtlich der beiden Gesichtspunkte Wachstum und Sterberate direkt dem MNCI vergleichbar. Nach 72 Stunden im Brutschrank liegen die Endwerte der beiden Substanzen im Bereich des Wachstums in gleicher Höhe, im Bereich der abgestorbenen Zellen differieren sie praktisch nicht.
Abb. 14 zeigt in gleicher Weise die konzentrationsabhängige Wirkung von 5-FU und MTX. Hier wurde für beide Stoffe der Bereich der völligen Wirklosigkeit ermittelt, um eindeutige Aussagen für die Kombinationen machen zu können.

Für 5-FU lag dieser Bereich bei einer Konzentration von 10^{-6} M, für MTX lag er bei $2,5 \times 10^{-8}$ M.
Mit dieser Dosierung konnten weder eine Wachstumsbeeinflussung, noch ein Ansteigen der Sterberate der LS_2-Kulturen erreicht werden.
Die Grundlage für die folgenden Versuche, die sich mit der Kombination dieser Konzentrationen befaßten, war nun geschaffen.
Wie aus einem mehrmaligen Kontrollversuch (Abb. 15) hervorgeht, können folgende Einzel-Dosierungen als eben ineffektiv gelten :

Azathioprin	8×10^{-6} M
MNCI	7×10^{-5} M
5-FU	1×10^{-6} M
MTX	$2,5 \times 10^{-8}$ M

In den Abb. 15 und 16 sind die Einzelsubstanzen und ihre Kombinationen in den o. a. Konzentrationen im 24-Stunden-Meßintervall vom Zeitpunkt 0 Stunden bis zum Endwert nach 72 Stunden dargestellt.

Abb. 15 : Beeinflussung des Zellwachstums durch die Einzelsubstanzen, Beobachtungszeitraum bis 72 Stunden im 24-stündigen Intervall

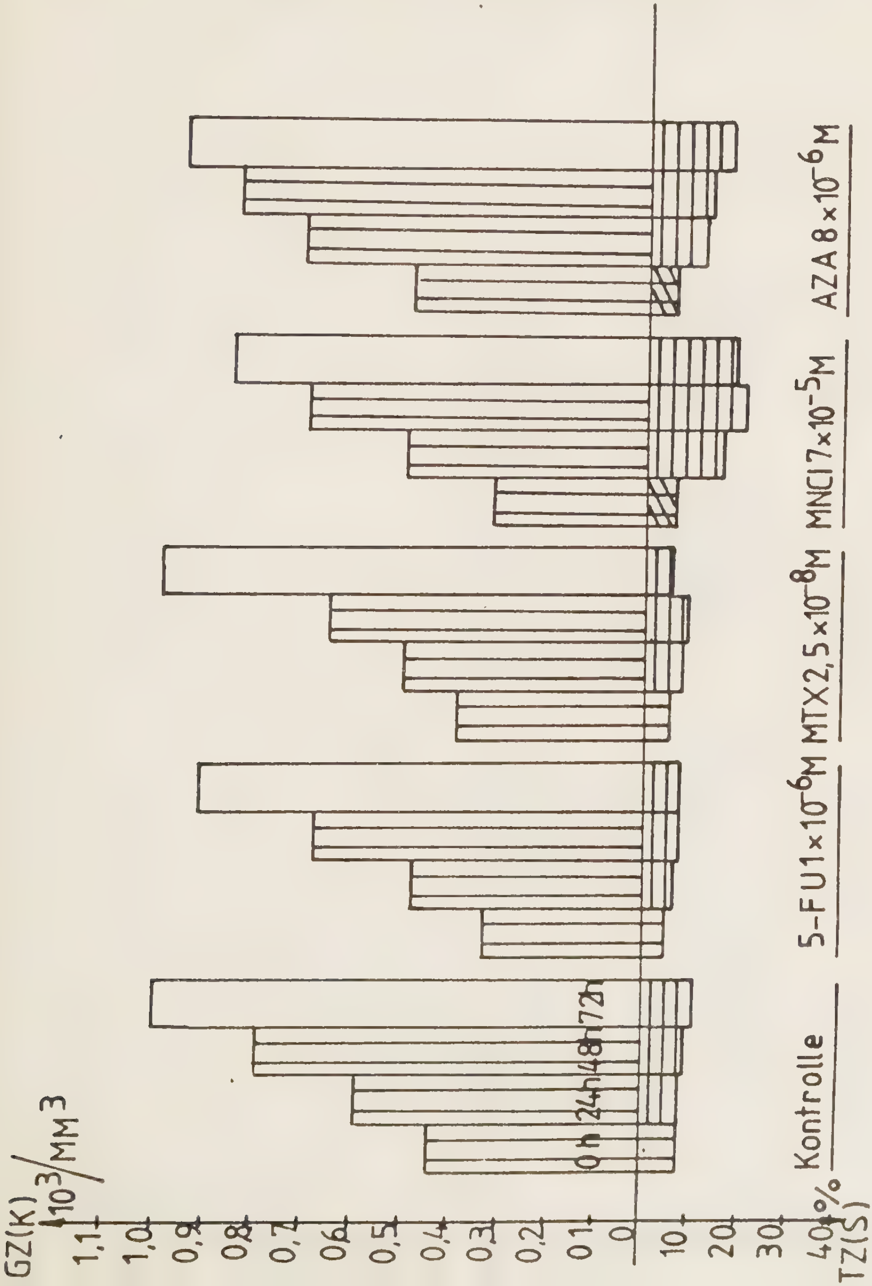
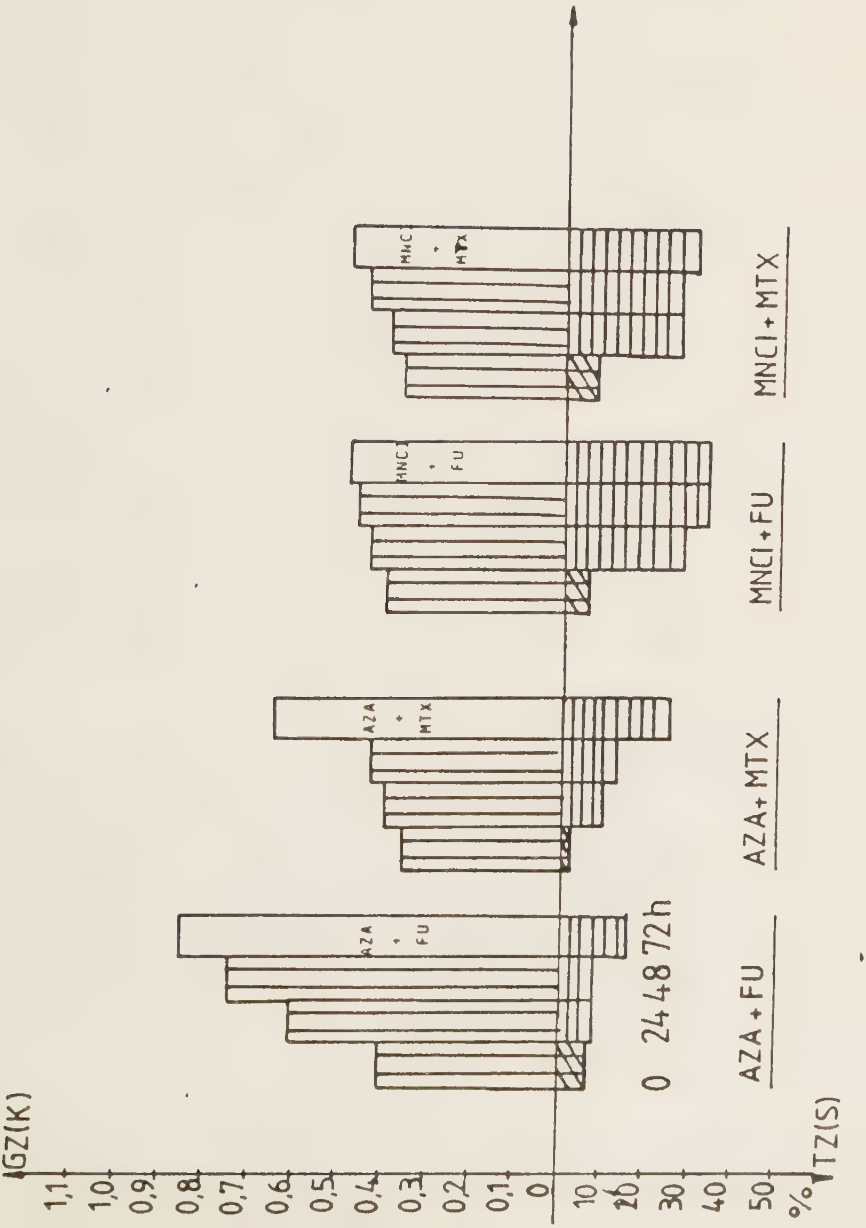


Abb. 16 : Beeinflussung des Zellwachstums durch die Substanzkombinationen, Verlaufsbeobachtung über 72 Stunden im 24-stündigen Intervall



Mit einem Anwachsen auf 0,91 bei 5-FU und auf 0,99 bei MTX, wobei die Ausgangswerte beide Male niedriger lagen als bei der Kontrolle, sind die Substanzen in den hier verwendeten Dosierungen eindeutig als unwirksam zu bezeichnen.
Sogar die ermittelten Prozentwerte der toten Zellen zum Zeitpunkt 72 Stunden liegen unter dem, von der Kontrollzellreihe vorgegebenen Wert.
Hinsichtlich des Wachstums ist auch Azathioprin mit der Kontrollpopulation vergleichbar, da auch diese Kultur bis auf einen Wert von 0,95 bei etwas höherem Ausgangsniveau anwächst.
Bei Betrachtung der Prozentwerte für die toten Zellen wird deutlich, daß Azathioprin ähnlich wie MNCI an der Schwelle seiner Wirksamkeit liegt :
Der zytotoxische Effekt ist bereits nachzuweisen, noch ehe der wachstumshemmende einsetzt. Für diese Behauptung stehen die gegenüber der Kontrolle höheren Absterberaten nach 24, 48 und 72 Stunden.
Mit den verwendeten Konzentrationen liegen diese beiden Substanzen, Azathioprin und MNCI, in einem vergleichbaren Bereich, dessen besonderer Wirkungscharakter anscheinend von großer Bedeutung ist, wie im Folgenden noch zu sehen sein wird.

In Abb. 16 wurden nun die unwirksamen Konzentrationen der Antimetabolite 5-FU und MTX mit den Schwellenwertdosierungen von AZA und MNCI zusammengebracht.
Die Kombination von AZA mit 5-FU zeigt hinsichtlich der Zellzahlen abgestorbener Zellen nach 72 Stunden keinen wesentlichen Unterschied zu denen, die mit AZA allein ermittelt wurden (vergl. Abb. 15). Die Kombination erzielt hier keinen Anstieg der Absterbequote.

Das Wachstum unter der Kombination AZA + FU liegt kaum unter dem Wert für AZA alleine.
Das Wachstumsverhalten beider Kurven im Verlauf betrachtet, also mit den Werten nach 24 und 48 Stunden, ergibt ein nahezu identisches Bild mit dem größten Wachstumsschub innerhalb der ersten 24 Stunden und mit weiteren, jedoch kleineren, die nachfolgen.
Beide Kulturen wachsen auch noch in der Endphase, zwischen der 48ten und 72ten Stunde, gleichsinnig an, so daß ein additiver, wachstumshemmender oder zytostatischer Effekt für die Kombination der gewählten Konzentration von AZA mit 5-FU nicht nachweisbar ist.

Für AZA mit MTX kombiniert, sieht die Darstellung deutlich anders aus :
Ausgehend von einem minimalen Prozentsatz toter Zellen am ersten Meßpunkt, steht eine Zunahme der Absterbeziffern im Vordergrund. Mit 25 % toten Lymphoblasten nach 72 h liegt die Kombination im zytotoxischen Bereich und damit über der Einzelwirkung von AZA.
Auch im Bereich des Zellwachstums stellt man eine verminderte Endgröße (0,65) fest, die sichtbar unter der für Azathioprin (0,95) allein gelegen ist.
Hier tritt nun erstmals ein Additionseffekt beider Substanzen auf. Der in unwirksamer Konzentration zugesetzte Stoff MTX erzeugt in der Verbindung mit AZA eine Wirkungsverstärkung, die sich auf beide Anteile des zytostatisch-zytotoxischen Prinzips erstreckt.
In den ersten 24 Stunden, die normalerweise durch den stärksten Wachstumsschub gekennzeichnet sind,

erzeugt die AZA/MTX Verbindung eine deutliche Dämpfung, die weitere 24 Stunden fortdauert und erst in der letzten Phase von einem überdurchschnittlichen Anwachsen der Kultur abgelöst wird. Hier scheint die Wirkung unterbrochen zu werden.
In der Darstellung der toten Zellen findet man ein umgekehrtes Bild. Nach 24 und 48 Stunden weicht die Kultur nicht bemerkenswert vom Normalbild für AZA bzw. für die Kontrolle ab. Sie weist einen kontinuierlichen, etwas stärkeren Anstieg der Absterbezahlen als die der Kontrolle auf (ähnlich wie mit AZA allein).
Der massive, zytotoxische Effekt erfolgt im letzten Meßintervall, in der Phase des stärksten Wachstums.
Für die Verbindung Azathioprin mit der unwirksamen Dosierung von MTX läßt sich hiermit ein Effektzuwachs ermitteln, der sowohl für das Zellwachstum als auch für das Absterbeverhalten geltend gemacht werden kann.

Der Vergleich der MNCI-Kombinationen mit den Einzelsubstanzen und deren Wirkungen macht deutlich, daß hier ein Effekt erzielt wird, der den Grad einer einfachen Summation der Einzeleffekte bei weitem übersteigt.
Da die Substanzen 5-FU und MTX in der Versuchskonzentration, einzeln betrachtet, ohne Wirkung waren, das Ergebnis jedoch auch den MNCI-Effekt übertrifft, muß hier ein zusätzlicher Mechanismus zum Tragen kommen. Dieser war nur feststellbar, wenn das Imidazolderivat in der Schwellendosis eingesetzt wurde. Versuche mit unwirksamen MNCI-Konzentrationen konnten keinen Effekt erzielen, ebensowenig, wie Versuche, in denen die Antimetaboliten in wirksamen Größen und MNCI in einer unwirksamen eingesetzt wurden.

Es kann also davon ausgegangen werden, daß der minimal wirksame Anteil des Imidazols Mechanismen in Gang setzt, die dann ihrerseits für die massive Wirkung der Kombination : wirkungsloser Antimetabolit +
MNCI Schwellendosis
verantwortlich sind.

In Abb. 16 ist zu erkennen, daß das Zellwachstum in den Verlaufsdarstellungen für MNCI/5-FU und für MNCI/MTX von Anfang an, also schon in den ersten 24 Stunden, beeinflußt wird. Es liegt weit hinter den als normal vorgegebenen Werten der Kontrollkurve und unter den Normgrößen für unbeeinflußtes Wachstum der Kulturen mit 5-FU und MTX. Die geringen Wachstumsschübe erfolgen über den ganzen Beobachtungszeitraum gleichmäßig, d.h. auch die Wirksamkeit der Kombination erstreckt sich über den beurteilten 72-Stunden-Zeitraum.
Dies steht im Gegensatz zu der AZA/MTX Verbindung, deren Wirksamkeit nach 48 Stunden abnimmt und von einem Anstieg der Zellzahlen zu diesem Zeitpunkt gefolgt wird. (Abb. 16)
Im Absterbeverhalten zeigen beide Kombinationen Unterschiede zu den bisherigen Beobachtungen für die Stoffkombinationen AZA/5-FU und AZA/MTX. In diesen Verbindungen erfolgte der größte Schritt in Richtung Zelltod stets nach der 48-Stunden-Grenze, also im letzten Beobachtungszeitraum.
Für die Imidazolverbindungen gilt dieser Grundsatz nicht. Schon der zweite Meßwert bei 24 Stunden ergibt den größten Sprung, ausgehend von völlig normalen 0-Stunden-Prozentzahlen.
Der weitere Anstieg von TZ(S) korreliert mit dem geringen Wachstum in dieser Zeit.

Es scheint, als ob jeder Versuch des Zellwachstums sofort mit einem Absterben beantwortet wird.
Demnach ist ein reelles Anwachsen der Zellpopulation nicht eindeutig nachzuweisen, lebende Zellen nach 72 Stunden könnten auch Übriggebliebene vom Anfangswert sein.

Zusammenfassend kann man feststellen :
Die Kombination des MNCI in seiner Schwellendosierung mit den unwirksamen Konzentrationen der Zytostatika 5-FU und MTX erzielt einen Effekt, der nicht als Additionseffekt bezeichnet werden kann. Es scheint sich vielmehr um eine potenzierende Wirkung zu handeln, die im Wachstumsbereich wie im Absterbeverhalten nachzuweisen ist.

3.3 Vergleichende Betrachtung der Wirkungsqualitäten von 6-Mercaptopurin und Azathioprin bei äquimolarer Konzentration beider Stoffe

6-Mercaptopurin, bekannter Purinantagonist und Spaltprodukt im Stoffwechsel des Azathioprins, wurde als Einzelsubstanz und in Kombination mit 5-FU, MTX und MNCI in seiner zytostatisch/zytotoxischen Wirkung auf Lymphoblastenkulturen untersucht.
Als Vergleichsgrundlage diente außer der Kontrollkultur der in gleicher Konzentration zugesetzte Wirkstoff Azathioprin.
Ziel der Untersuchungen war, die Bestätigung oder den Gegenbeweis dafür zu erbringen, daß 6-Mercaptopurin (im weiteren : 6-MP) bei der Spaltung aus Azathioprin im gleichen molaren Verhältnis entsteht, wie AZA vorliegt.

3.3.1 Bezug/Vergleich der Ergebnisse

3.3.2 Darstellung der Ergebnisse

Bezüglich des Bezugs/Vergleichs und der Darstellung der Ergebnisse gilt das unter 3.1.1 (Seite 53) bzw. 3.1.2 (Seite 54) Beschriebene.

3.3.3 Beschreibung der Ergebnisse

Sowohl AZA, als auch 6-MP wurden in einer Konzentration von $8x10^{-6}$ M in allen aufgeführten Versuchen eingesetzt. AZA liegt damit, wie bereits unter 3.2.3 beschrieben, annähernd an einer Schwelle ohne Auswirkung auf das Wachstum der Zellen, jedoch mit geringer zytotoxischer Komponente.

Für die Kombinationen wurden die in ihrer Wirkung bereits bekannten Dosierungen für 5-FU, MTX und MNCI eingesetzt, also für 5-FU 10^{-6} M, für MTX $2{,}5 \times 10^{-8}$ M und für MNCI 7×10^{-5} M. Damit waren erneut die unwirksamen Konzentrationen der vorausgegangenen Versuche unter 3.2.3 Grundlage der Beurteilung nachstehender Ergebnisse.

In Abb. 17 liegen AZA und 6-MP als Einzelsubstanzen vor. Es ist deutlich zu erkennen, daß ein gleichmolares Verhältnis beider Stoffe zu einer unterschiedlichen Wirkung auf die Zellkulturen führt.
AZA liegt im erwarteten Bereich hinsichtlich des uneingeschränkten Zellwachstums und des erhöhten Prozentsatzes toter Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Die postulierte Schwellenkonzentration findet in der Darstellung erneut eine Bestätigung.
Für 6-MP sieht die Graphik im Bereich Wachstum und im Bereich Absterberate verändert aus :
Ein zytostatischer Effekt läßt sich aus dem Gesamtzellenendwert und gleichermaßen aus dem Wachstumsverlauf ableiten. Dieser stagniert zwischen der 48ten und 72ten Stunde, obwohl sich bis zu diesem Zeitpunkt ein stetes Wachstum abzeichnet. Der zytotoxische 6-MP-Effekt setzt bereits nach der 24ten Stunde ein und erreicht einen Endwert, der das 4-fache des AZA-Endwertes beträgt.
6-MP liegt damit trotz gleicher Konzentration wie AZA weit im toxischen Bereich mit Wachstumshemmung und verstärkter Zellabtötung.

Abb. 18 zeigt nun die Kombinationen von 5-FU und MTX mit 6-MP und AZA und vergleicht die Wirkungen nach 72 Stunden.

Für sämtliche AZA-Kombinationen wird eine geringe, zusätzliche Hemmung des Wachstums, im Vergleich mit der AZA-Einzeldosis, erkennbar. Auch die Prozentwerte der abgestorbenen Zellen liegen auf höherem Niveau, insbesondere die Verbindung mit MNCI.

Für 5-FU und MTX und MNCI kann in der Verbindung mit 6-MP keine additive Wirkung nachgewiesen werden. Wachstumsgesamtzellzahl und tote Zellen liegen im Bereich des alleinigen Wirkungsumfanges von 6-Mercaptopurin.

Zusammenfassend stellt sich 6-MP bezüglich zytostatischer und zytotoxischer Wirksamkeit als wesentlich potentere Substanz im Vergleich zu AZA bei gleicher Dosierung heraus.
Auch in Kombination scheint 6-MP ausschließlich die eigene Wirkung einzubringen ohne erkennbar Auslöser für zusätzliche zytostatische oder zytotoxische Effekte durch die mitverabreichten Substanzen zu sein.

Abb. 17 : Vergleich AZA/6-MP, Äquimolare Konzentration, Verlaufsbeobachtung des Zellwachstumsverhaltens

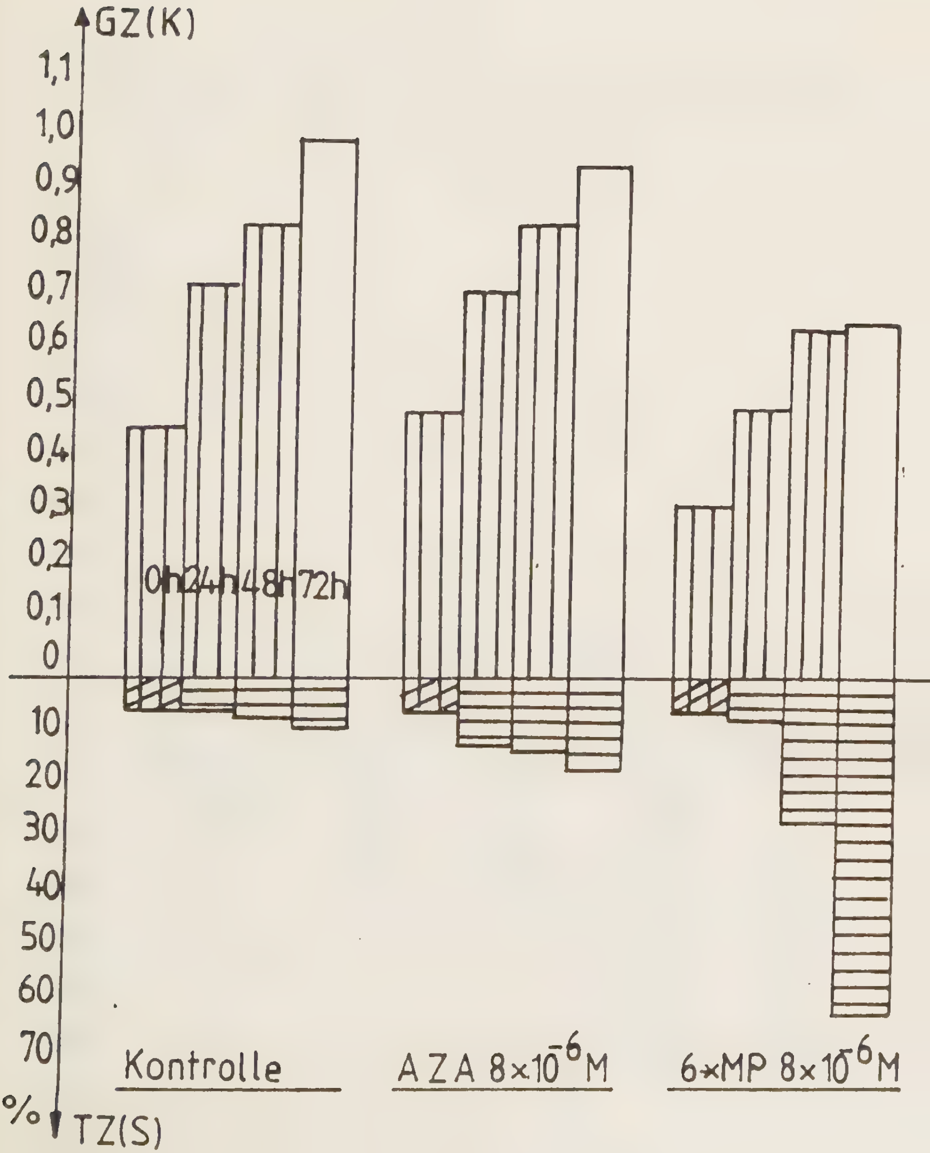
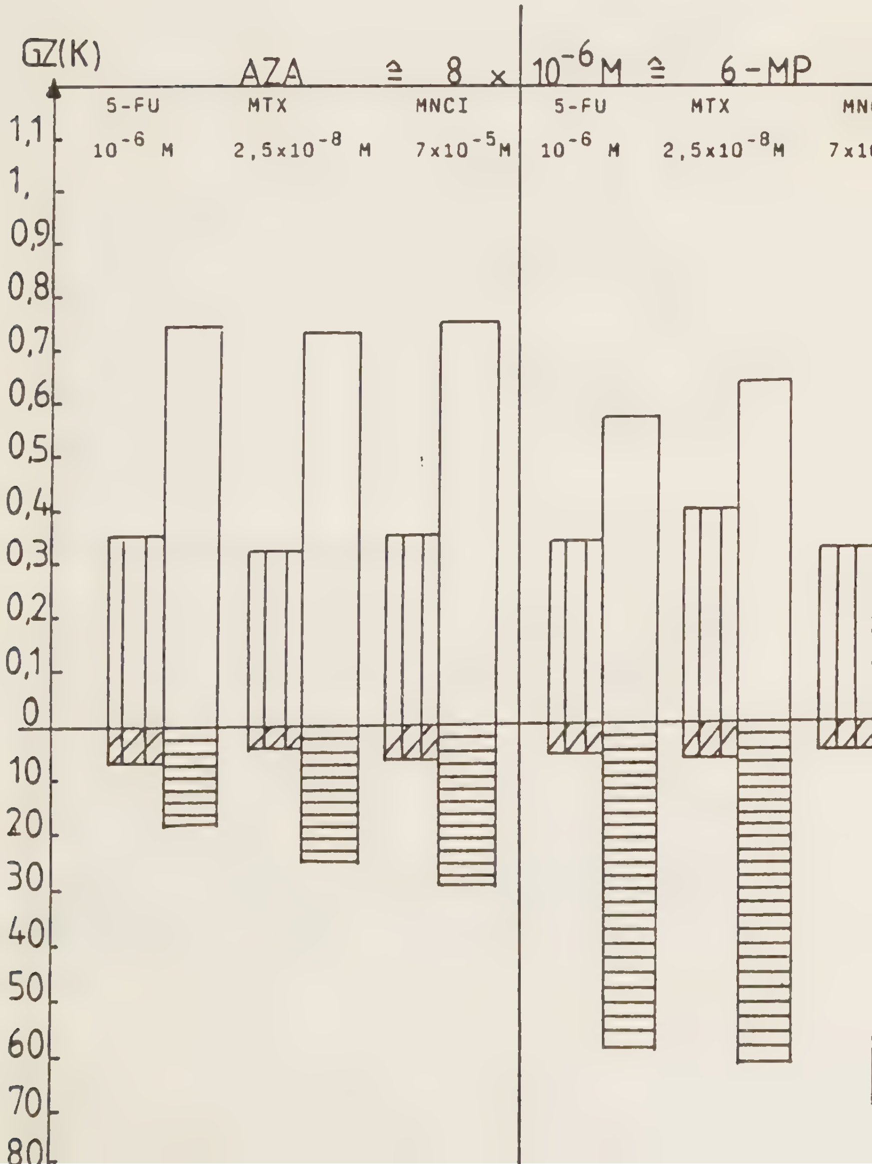


Abb. 18 : Kombinationen aus AZA und 6-MP mit 5-FU, MZX, MNCI, AZA/6-MP in äquimolarer Konzentration



4 Diskussion

4.1 Wirkungsmechanismen von Nitroimidazolen

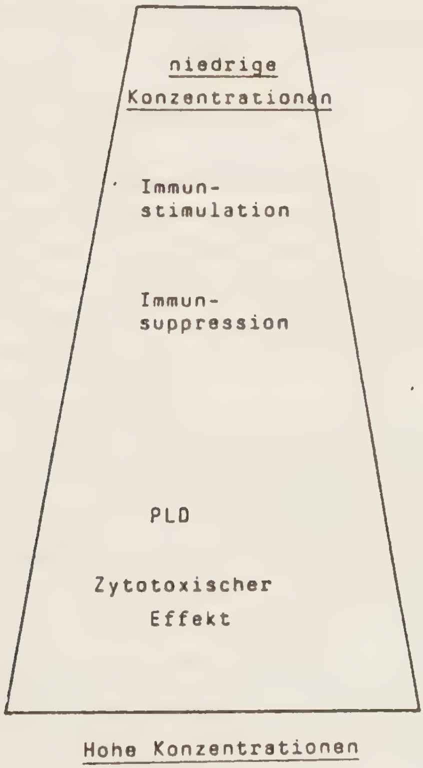
Bei der intensiven Forschung über den Wirkungsmechanismus der als Sensitizer eingesetzten Nitroimidazole wurde als bedeutender Faktor das Einwirken der Imidazolverbindung auf das intrazelluläre Redox-System erkannt.
Daß dieser Mechanismus die Grundlage für viele, den Imidazolen zugeschriebenen Eigenschaften bildet, ist außer Diskussion. Die Vielschichtigkeit der möglichen Angriffspunkte der Imidazole im biochemischen Stoffwechsel der Zelle ist weiterhin Gegenstand wissenschaftlicher Arbeiten. Vor die Interpretation der eigenen Versuchsergebnisse soll im folgenden zunächst ein Einblick in die molekularen Mechanismen der Imidazolwirkung vermittelt werden, um das theoretische Verständnis für die Deutung der Versuche zu erlangen.

4.1.1 Subletale Konditionierung

Oftmals setzen nicht die Imidazolderivate allein eine letale Schädigung der Zellen, sondern erst die Kombination dieser mit Bestrahlung und/oder Chemotherapie führt zum Untergang der Zellpopulation (3, 47).
Damit liegt die Annahme nahe, daß ein wichtiger Mechanismus der Imidazolwirkung im Setzen von subletalen Schäden liegt, die für sich alleine keinen Zelluntergang bewirken können, die Zelle jedoch für zusätzliche physikalische oder chemische Noxen sensibilisieren und damit dem Zelltod wegbereitend sein können (36, 64, 100).

Dieser Bereich der subletalen Konditionierung oder des " potentially lethal damage ", im weiteren PLD genannt, ist konzentrationsabhängig (55, 100). Er liegt zwischen dem immunstimulierenden Effekt für niedere Konzentrationen und dem immunsuppressiven oder zytotoxischen für höhere und hohe Konzentrationen.

Abb. 19 : Dosisabhängige Imidazoleffekte



4.1.1.1 Redox-Potential

Eine bedeutsame Imidazolwirkung liegt darin, das Redox-Potential der Zelle aus dem Gleichgewicht zu bringen (3, 5, 56, 98).
Als empfindliches System, ständig den intrazellulären Stoffwechselprozessen ausgesetzt, bedarf es einer dauerhaften Regulation durch Verbindungen, die ein Gleichgewicht zwischen oxidierenden und reduzierenden Prozessen aufrechterhalten.
Im engen Zusammenhang damit steht die Wirkung der Nitroimidazole als elektronenaffine Verbindungen.

4.1.1.1.1 Radikalbildung

Die Fähigkeit, Elektronen anzuziehen und zu binden, also als oxidierende Substanz zu agieren, machte die Imidazole ursprünglich zu einer geeigneten chemischen Substanz, um die durch Bestrahlung induzierte Polarisation eines DNS-Moleküls, in ein freies Radikal und einen mit einem Anion beladenen Elektronenakkzeptor überzuführen.
Damit reagieren die Imidazolderivate wie das Sauerstoffmolekül, d. h., auch, wenn sie Unterschiede im Wirkungsmechanismus aufweisen, so besitzen sie doch die Fähigkeit, oxidierend zu wirken und damit gesetzte Schäden an der DNS zu fixieren, entstandene Radikale zu oxidieren, oder diese durch Elektronenanziehung zu erzeugen.
Wie bereits unter 1.1 erwähnt, besteht innerhalb der Gruppe der Nitroimidazole eine unterschiedliche Fähigkeit, elektronenaffin zu wirken, wobei die 2-Nitroimidazole das höchste Potential besitzen, um Elektronen anzuziehen.

Daß auch etwaige Seitenketten eine Rolle spielen können, indem sie die Affinität eines Imidazols wesentlich verstärken können, wurde bereits erwähnt.
Auch die Tatsache, daß Imidazolverbindungen dissoziieren können, ehe sie mit dem Meßindikator reagieren und hierdurch falsch-niedrige Potentiale gemessen werden können, muß in die Betrachtung zur Elektronenaffinität miteinbezogen werden. Eine solche falsch-niedrige Potentialbestimmung könnte z. B. für MNCI der Fall sein, welches in 100-fach niederer Dosierung die gleiche Wirkung hat, wie vergleichbare 2-Nitroimidazole mit besonders hohem Affinitätspotential.

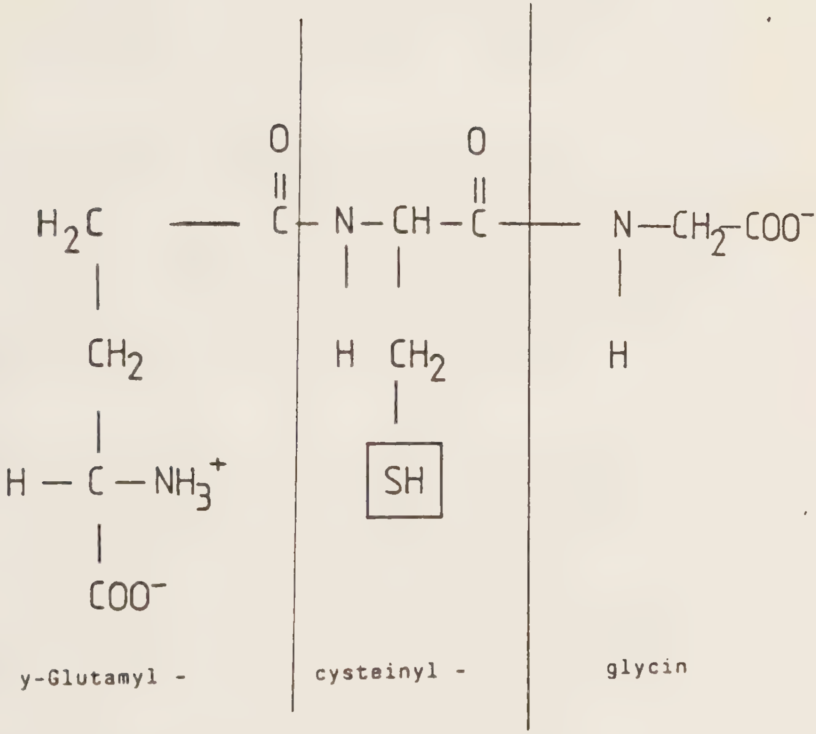
Mit der genannten Fähigkeit der Elektronenbindung und damit der Radikalbildung tragen die Nitroimidazole wesentlich zur Erzeugung eines subletalen Schadens bei. Dieser kann dann in einen manifesten Schaden übergehen, wenn die intrazellulären Mechanismen, die die Veränderungen im Redox-System ins Gleichgewicht bringen sollen, durch eine Vielzahl von gesetzten Schäden überfordert sind.

4.1.1.1.2 <u>Die Rolle des Glutathion und anderer Reparatursysteme</u>

Die biochemischen Prozesse im Innern der Zelle zur "Entgiftung" durch Oxidation von freien Radikalen, "Fixierung" einer Schädigung durch Reduktion und Regulierung des Gleichgewichts des Redox-Systems laufen meist über Peptide (vergl. dazu Abb. 4 ,Seite 8).

Die Fähigkeit zur Reduktion besitzen vor allem SH-Gruppen, NH_2-Gruppen, NADH und als besonders wichtiger Vertreter das Glutathion.

Abb. 20 : Chemische Struktur des Glutathions



Glutathion ist ein Tripeptid aus Glycin, Cystein und Glutamat. Eine entscheidende Bedeutung für die Funktion besitzt die Sulfhydryl (SH)-Gruppe des Cysteinylrestes, die bei physiologischem pH-Wert in undissoziierter Form vorliegt. Diese SH-Gruppe wirkt als Elektronendonator und kann daher beispielsweise Hydroperoxide von Makromolekülen (Enzymen, Membranproteinen) reduzieren, die die Funktion dieser Moleküle stark beeinträchtigen (3, 58, 79).

Oxidiertes und reduziertes Glutathion bilden ein den Pyridinnukleotiden vergleichbares Redox-System, bei dem die reduzierte Form zu 90 % vorliegt (3, 58, 79). Wegen des stark negativen Redox-Potentials (E_0 = -0,25 V) und der leichten Oxidierbarkeit von Glutathion muß reduziertes Glutathion ständig durch die Glutathionreduktase, die mit NADPH aus dem Pentosephosphatweg arbeitet, regeneriert werden.

Wenn zur Konstanthaltung des Redox-Potentials von Zellen Glutathion eine entscheidende Rolle spielt, Nitroimidazole jedoch genau hier durch Radikalbildung und Oxidation eine Störung im System hervorrufen, so liegt die Vermutung nahe, daß mit zunehmendem Schwinden des zellulären GSH-Vorrats (= reduziertes Glutathion), die Möglichkeit einer letalen Schädigung des Zellstoffwechsels wächst.

Der durch Nitroimidazole gesetzte Schaden kann dann zum Zelltod führen, wenn die Glutathionreduktase trotz maximaler Leistung nicht mehr genügend GSH zur Verfügung stellt und damit eine Reparatur von radikalbedingten Strangbrüchen in der DNS und von Defekten in Proteinen und Membranen unmöglich wird.

Auch das Enzym Glutathionperoxidase, das auf die Wasserstoffperoxide ungesättigter Fettsäuren wirkt, dient dem Schutz vor Peroxidation von Membranlipiden der Zelle. Auch diese Wasserstoffperoxide entstehen unter Einwirkung von Radikalen und führen, außer in ungesättigten Fettsäuren auch in Proteinen, Kohlehydraten und Nukleinsäuren zu Strukturänderungen wie Polymerisationen und Kettenbrüchen, so daß diese Moleküle ihrer Funktion nicht mehr gerecht werden können (3, 58).

Hier liegt die Verbindung zu den Nitroimidazolen ebenso nahe, denn sobald die Integrität der Zellmembran durch vielfache Peroxidation nicht mehr gegeben ist und die Kapazität des Reparaturenzyms erschöpft ist, droht die Zerstörung der Zelle.

Zuletzt soll noch auf die Fähigkeit von 1-Methyl-4-Nitro-5-Chloro-Imidazol hingewiesen werden, auch selbst mit SH-Verbindungen, d. h. mit Glutathion, reagieren zu können. Es entsteht dann 5-Glutathionyl-1-Methyl-4-Nitro-Imidazol (MNGI), die Verbindung, die auch bei der Spaltung von Azathioprin entstehen kann (43).

Auch durch diese Reaktion wird Glutathion für seine Aktivität als Elektronendonator im Redox-System der Zelle blockiert und steht damit dieser zur Regulation nicht mehr zur Verfügung, wodurch eine PLD weiter in Richtung Zelltod geführt werden kann (43, 58).

4.1.1.2 Bildung hochreaktiver Verbindungen

In Forschungsarbeiten früherer Jahre war bereits gefunden worden, daß Misonidazol und auch andere Nitroimidazole unter hypoxischen Bedingungen Verbindungen wie Hydroxyl - und Nitrosamine bzw. Amine selbst bilden können (43, 61, 97, 100).
Die vollständig reduzierte Aminform ist dabei weniger toxisch, als die nur teilweise reduzierten Zwischenprodukte.
Diese Intermediate sind dann aber auch für euoxische Zellen, wie dies für die Kanzerogenität von Nitroso-Verbindungen bekannt ist, schädlich.
Für die Bildung von Nitroso-Verbindungen ist die Fähigkeit zur Elektronenaufnahme von Nitroimidazolen ausschlaggebend. Nach bisheriger Auffassung führen Amine vor allem in ihrer hydroxylierten oder sulfatierten Form zu gravierenden Beeinträchtigungen des Zellstoffwechsels (43). Diese können z. B. in der Hemmung der Pyruvatcarboxylase, die Oxalacetat für den Citratzyklus liefert, und der Blockierung der mitochondrialen Adenosintriphosphatbildung nachgewiesen werden.
Als interessante Verknüpfung mit dem bereits angeführten Glutathion läßt sich hier die mögliche Entgiftung solcher Stoffe über die Leber anführen :
Zu den zahlreichen Entgiftungs- und Konjugationsreaktionen der Leber gehört auch die Mercaptursäurebildung. Diese Säuren sind Thioäther mit N-Acetylcystein, das dem großen Pool an Glutathion in der Leber entstammt.
Somit stellt die Bildung von hochreaktiven Stoffwechselintermediaten einen weiteren Schritt zur PLD und damit, bei Überschreitung einer bestimmten Grenze, den Übergang zum Absterben der Zelle dar.

4.1.1.3 Bioreduktive Alkylierung

Ein weiterer nachgewiesener, aber noch kaum erforschter Weg der Nitroimidazolwirkung ist die bioreduktive Alkylierung von Makromolekülen. Sie gleicht der Wirkungsweise von Zytostatika, die als sogenannte Alkylantien Verwendung finden. Für alle Alkylantien, wie z. B. Busulfan, Chlorambucil, Melphalan, Cyclophosphamid und auch Nitrosoharnstoffe, ist die Alkylierung von Amino-, Sulfhyryl-, Carboxyl- und Phosphatgruppen gültig.

Besonders bedeutend erscheint die Alkylierung des Stickstoffs in Position 7 des Guanins der DNS.
Diese kann verschiedene Folgen bedingen :
Teile der DNS können für die Replikation ausfallen, weil zwei Guanine über Brückenbildung gekoppelt werden können oder das alkylierte Guanin wird falsch als Adenin abgelesen und verbindet sich nicht mehr mit Cytosin zum richtigen, sondern mit Thymin zum "falschen Basenpaar" (43).

Da die Natur ebenso schädigenden Noxen ausgesetzt ist, wie z. B. dem UV-Licht, welches zur Dimerisierung von benachbarten Thyminbasen führen kann, die dann ihrerseits eine Reduplikation des DNS-Stranges verhindern, stellt sie der Schädigung einen Reparaturmechanismus entgegen, der unter Enzymeinsatz vollzogen wird.

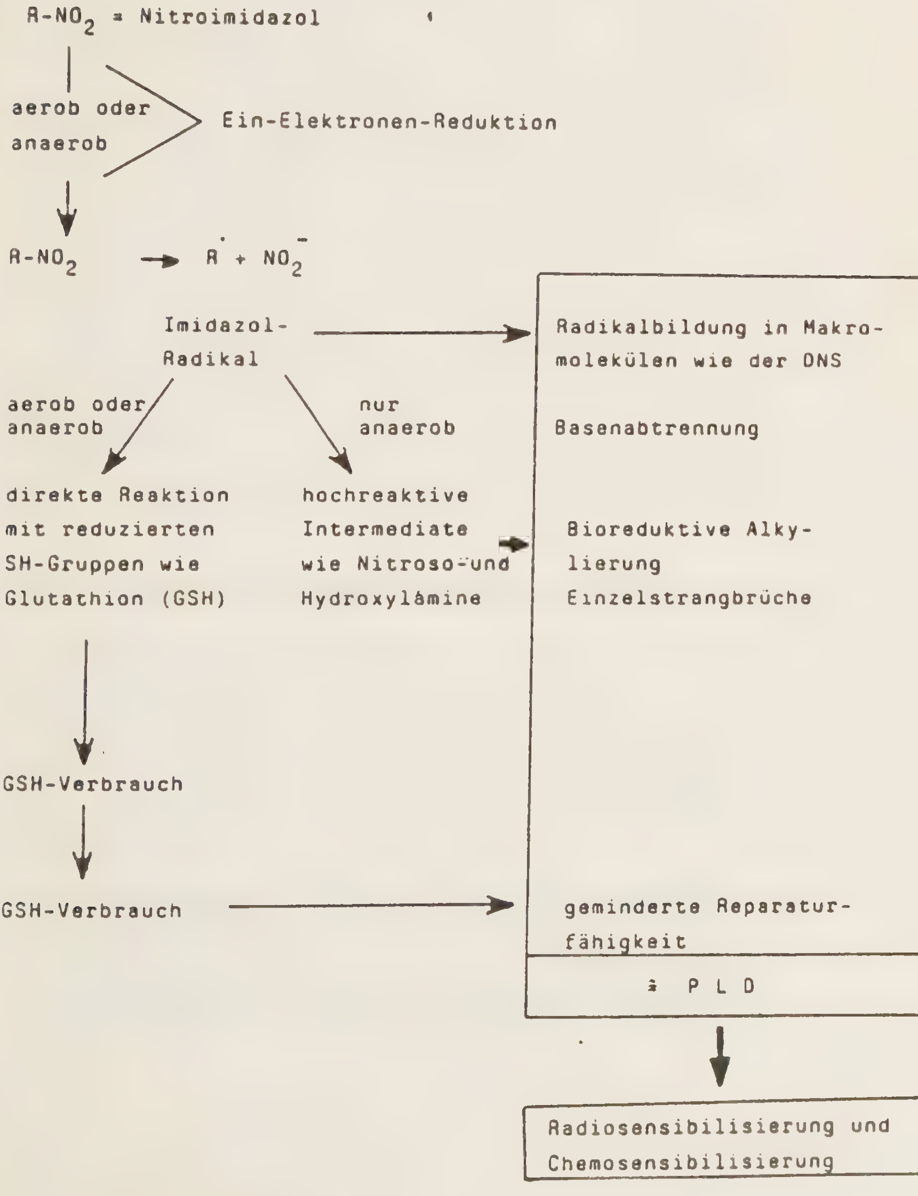
Diese Enzyme erkennen Schäden, spalten die DNS, entfernen den geschädigten Abschnitt und korrigieren die DNS solange, bis sie ihre normale Basensequenz wiedererlangt hat (3, 43).
Dieser Vorgang ist jedoch nur in begrenztem Umfang

möglich, sei es durch Erreichen des Leistungsoptimums der Enzyme oder durch zu ausgedehnte Schädigungen mit Fehlern in der Resynthese.
Dieser Umstand mag eine plausible Erklärung für die nachgewiesene Wirkungsverstärkung von Nitroimidazolen in Verbindung mit den Alkylantien darstellen (s. 3.2.3).
Da auch für den Reparaturmechanismus von DNS-Schäden Elektronendonatoren wie z. B. Glutathion (GSH) oder NADPH nötig sind (43), wird mit deren Verbrauch ein weiterer Übergang vom PLD zum Zelltod geschaffen.

Für diesen Wirkungsmechanismus konnte eine direkte Korrelation zwischen DNS-brüchen in hypoxischen Zellen und der Konzentration des Nitroimidazols, sowie der Temperatur nachgewiesen werden (3, 67, 85).
Auf die Bedeutung der Temperatur soll in 4.2 noch weiter eingegangen werden.

In Abb. 21 werden verschiedene durch Nitroimidazole induzierte, PLD-Reaktionen beschrieben und ihr Zusammenhang dargestellt.

Abb. 21 : Nitroimidazolinduzierte "potentially lethal damage"



4.2 Aktivitätsbereiche von Nitroimidazolen

Nachdem nun die möglichen Interaktionen von Nitroimidazolen im Stoffwechsel der Zelle bekannt sind, sollen ihre Einsatzmöglichkeiten und Wirkungsqualitäten erläutert werden.
Dabei ist die hier vorgegebene Einteilung hinsichtlich der Zielwirkung nicht gleichzusetzen mit ebenso getrenntem Kausalitätsmodus. Vielmehr können bei jeder Art des Einsatzes von Nitroimidazolen alle oder zumindest eine Kombination der möglichen Wirkungsmuster zusammenarbeiten.
Außer für die Therapie von Anaerobier-Infektionen, werden Nitroderivate von Imidazolen in der Radiotherapie zur Sensibilisierung hypoxischer Zellen eingesetzt, wird ihnen ferner eine Zytotoxizität insbesondere für hypoxische aber auch für euoxische Zellen zugesprochen und ist ihre sensibilisierende Eigenschaft gegenüber schlecht oxygenierten Zellpopulationen für die Chemotherapie nachgewiesen.

4.2.1 Radiosensibilisierung hypoxischer Zellen

Der Grund für die Entwicklung von Radiosensitizern wurde bereits dargelegt (S. 4).
Die biochemischen Zusammenhänge für das gemeinsame Wirken von Sensitizern und Bestrahlung wurden mit den vorausgegangenen Erläuterungen im Punkt 4.1 (S. 76) angesprochen :
Daß UV-Licht im allgemeinen und ionisierende Bestrahlung im besonderen zahlreiche Läsionen im intrazellulären Nukleoproteinpool setzen können, ist bekannt. Diese Läsionen äußern sich in Form von Einzel- und Doppelstrangbrüchen, Basenzerstörung bzw. Veränderung

der Basensequenz, Überlappungen und Ringschlüssen von Molekülen und schließlich in Form von Chromosomenaberrationen in der Mitosephase.
All diesen, auch unter natürlichen Bedingungen entstehenden DNS-Strangbrüchen und DNS-Fehlvernetzungen steht das biologische Reparatursystem der Zelle gegenüber.
Im Falle der Radiosensibilisierung von hypoxischen Zellen fungieren die verwendeten Nitroimidazole, wie unter 1.1 (S. 4 - 13) erwähnt, als sauerstoffähnliche Substanzen und führen über den Weg der Oxidation von zellschädigenden Verbindungen (z. B. freie Radikale) zur Fixation des Schadens, der nur durch eine Reparatur, in diesem Fall durch Reduktion, behoben werden kann. Die hierfür notwendigen Enzyme bzw. Peptide sind bereits beschrieben worden.
Für die Effektivität eines Sensitizers ist außer seiner Verteilung im Gewebe und der Umgebungstemperatur auch die verwendete Konzentration ausschlaggebend. Hier zeigt sich schnell die enge Verknüpfung von effektiver Wirkung und Toxizität, die beide ein Resultat der elektronenaffinen Potenz des Sensitizers darstellen.
Mit dem untersuchten MNCI wäre eine Substanz gefunden, die als Sensitizer in einer Konzentration genügend Effizienz zeigt, die weit unter den Erfahrungswerten für bisherige Sensitizer liegt.
Damit wäre vielleicht ein Schritt in Richtung geringere Toxizität erreicht.

4.2.2 Zytotoxizität gegenüber hypoxischen Zellen

In früheren Versuchen stellte man fest, daß Nitroimidazole auf hypoxische Zellen weitaus toxischer

wirken, als auf oxygenierte (3, 5, 6, 72, 78). Dieser Unterschied in der Zytotoxizität wird für Misonidazol in Abb. 5 (Seite 9) dargestellt.

Für den Zusammenhang zwischen Zytotoxizität und Elektronenaffinität der Nitroverbindungen gilt, daß diejenigen mit der stärksten Affinität die größte Toxizität erzeugen. Die Toxizität ist temperatur- und pH-Wert-abhängig und variiert innerhalb verschiedener Zellpopulationen (3, 14, 23, 65).

Laut 4.1 fand man heraus, daß Nitroverbindungen selbst Radikale und über den Weg der Verstoffwechslung auch toxische Zwischenprodukte, Nitroso-Verbindungen und Hydroxylamine, bilden können.
Da der über Radikalbildung entstehende Zellschaden sowohl in hypoxischen, als auch in euoxischen Zellen nachzuweisen ist, ferner die Bildung des Radikalenanions RNO_2- in beiden Zellgruppen stattfinden kann, muß der Grund für die Bevorzugung hypoxischer Zellen hinsichtlich der Toxizität wohl in deren O_2-Mangel zu finden sein (13, 24, 25, 35, 37, 62, 72).

Dieser Forderung folgen die Stoffwechselzwischenprodukte der Imidazole, die ausschließlich in Hypoxie gebildet werden und umso toxischer wirken, je unvollständiger sie reduziert wurden (43, 56, 69, 70, 88). Diese Nitroso- und Aminverbindungen erweisen sich für oxygenierte Zellen ebenso als toxisch und können daher normales Gewebe bzw. die oxygenierte Umgebung eines minderversorgten Tumorareals schädigen.

Die Konzentrationsabhängigkeit der Toxizität ist durch die Metabolisierung der Substanzen zu verstehen, insofern, als mit zunehmender Konzentration auch mehr toxische Produkte gebildet werden können,

woraus sich auch das Einfließen des Zeitfaktors erklärt (43, 53, 56).
Innerhalb eines Tumors würde dies bedeuten, daß mit zunehmender Konzentration und damit Zunahme der Schadstoffe auch die oxygenierten Zellen per Diffusion erreichbar und verletzlich wären.

4.2.2.1 Temperaturabhängigkeit der Toxizität

Die Toxizität von Nitroimidazolen ist ein temperaturabhängiger Prozeß. Eine Erwärmung um wenige Grade (von 37° auf 41° C) bewirkt einen deutlichen Zuwachs an Toxizität, was für Misonidazol beispielsweise nachgewiesen wurde (75, 83, 85).
Man nimmt an, daß über den Weg der Hyperthermie die Reduktion von Nitroderivaten gesteigert und damit ihre Fähigkeit oxidierend zu wirken, bzw. Radikale zu fixieren, in einem Maß gesteigert wird, welches wiederum die Repairfähigkeit der einzelnen Zelle übersteigt.
Interessanterweise können über eine gezielte Erwärmung gerade jene Nitroverbindungen stärkste Wirkungssteigerungen aufweisen, die aufgrund ihres Redox-Potentials die am wenigsten wirksamen sind.
D. h. also, entgegen den bisherigen Beobachtungen, wonach die stärkste Elektronenaffinität die größte Zytotoxizität verursacht, liegen hier die Verbindungen mit der geringsten Elektronenaffinität ganz vorne (83, 85).

Eine logische Erklärung hierfür wäre die durch Wärme erzeugte Aktivierungsenergie, die im Falle der Substanzen mit geringer Affinität in wesentlich größerem Ausmaß benötigt wird, um deren volle Wirksamkeit zu entfalten, als im Falle der bereits hochwirksamen Nitroderivate mit hoher Elektronenaffinität, die in ihrer Reagibilität kaum noch gesteigert werden können (43, 83, 85).

Über den Weg der Hyperthermie könnten also diejenigen Imidazole mit den geringeren Nebenwirkungen zu effektivem Einsatz gelangen oder geringere Konzentrationen würden zum gewünschten Effekt führen.

4.2.2.2 pH-Wert und Zytotoxizität

Für den pH-Wert gilt für Imidazolverbindungen folgender Zusammenhang :
Eine Erniedrigung des pH-Wertes, also eine Ansäuerung des Umgebungsmilieus, in dem Imidazole wirksam werden, führt zu einer Steigerung der Toxizität (3, 65).
Speziell untersucht wurde diese Feststellung für Vitamin C (=Ascorbinsäure). Vitamin C steigert ähnlich wie die Temperaturzufuhr den zytotoxischen Effekt des Imidazolderivats. Der Nachweis hierfür wurde am Beispiel des Misonidazols erbracht (3, 50, 65).
Auch in diesem Fall stellt die Elektronenaffinität einen entscheidenden Faktor dar, insofern, als sie für das Ausmaß der Aktivitätssteigerung maßgebend ist.
Für Ascorbinsäure gilt ebenso die Feststellung :
Je niedriger die Elektronenaffinität und damit je weniger wirksam die Substanz ist, desto größer ist die Wirkungssteigerung unter Vitamin C-Zufuhr, unter Ansäuerung des Milieus (3, 50, 65).
Da hypoxische Zellen ihren Energiebedarf mittels anaerober Glykolyse aus Glukose decken, wie in Versuchen mit 5-Thio-D-Glukose, einem kompetitiven Inhibitor des aktiven Transports von D-Glukose, nachgewiesen worden ist (3, 50, 65), liegt hier ein saures Milieu mit niederem pH-Wert vor.
Eine mögliche Erklärung für die Zytotoxizität von Nitroimidazolen vorzugsweise gegenüber hypoxischen Zellen ist hiermit gegeben.

4.2.3 Chemosensibilisierende Wirkung

Die sensibilisierende Wirkung von Nitroimidazolen für die Chemotherapie war in zahlreichen Studien belegt worden (3, 29, 52, 53, 59, 62, 65, 74, 76, 87). Die ersten Erfahrungen waren in Kombination mit alkylierenden Substanzen wie Melphalan, Chlorambucil, Cyclophosphamid, Cis-Platin, BCNU und CCNU gesammelt worden. Anthrazykline, Antimetabolite (MTX, 5-FU), Bleomycin und Mitomycin C folgten.
Für alle war die Beobachtung der verstärkten Zytotoxizität unter zusätzlicher Imidazoleinwirkung gültig.

Die mögliche Erklärung hierfür wurde bereits gegeben : Ausschlaggebend für den vermehrten Zelltod ist die Verarmung an intrazellulärem, reduziertem Glutathion und Folge daraus, der irreparable DNS-Schaden.
Aus den Ausführungen zu 4.1 und 4.2 läßt sich folgendes ableiten :
Die Zytotoxizität der Kombination aus Nitroverbindung und Chemotherapeutikum ist von der Konzentration beider Derivate, der Expositionsdauer, der Temperatur, der O_2-Konzentration, dem pH-Wert und der Zellart abhängig. Daß die Konzentrationen wesentlich geringer gehalten werden können, als bei einzelner Verabreichung der Substanzen, geht aus den Versuchsergebnissen unseres Labors und dieser Arbeit hervor (s. S. 61ff).

4.2.3.1 Sauerstoff und Chemosensibilisierung

Die An- oder Abwesenheit von O_2 spielt bei der chemosensibilisierenden Wirkung der Nitroimidazole eine Rolle :
In Versuchen, in denen zuerst das Imidazol (Misonidazol), anschließend Sauerstoff und dann erst das Chemotherapeutikum Melphalan verabreicht wurden, konnte keine Wirkungssteigerung erzielt werden (16, 59).
In diesem Fall spielt wahrscheinlich nicht Glutathion die entscheidende Rolle, sondern die toxischen Intermediate aus dem Imidazolstoffwechsel, die nur unter Hypoxie gebildet und ihren Beitrag zur PLD leisten.
Eine weitere Erklärung hierfür mag durch den mikrosomalen Sauerstoffverbrauch gegeben sein :
Mit dem Redox-Potential von Nitroverbindungen steigt auch exponential der mikrosomale O_2-Verbrauch der Zelle aus ungeklärter Ursache.
Damit gerät die Zelle in einen hypoxischen Zustand, der die Bildung toxischer Imidazolmetaboliten fördert (54, 65, 66, 68, 79, 80, 82, 86). Mit der erneuten Zufuhr von O_2 kann dieser Mechanismus unterbrochen werden. Die Kombination mit stark elektronenaffinen Verbindungen in der Chemotherapie kann durch diesen Effekt, der besonders in den hypoxischen Bereichen eines Tumors von Bedeutung wäre, einen neuen Impuls geben.

4.2.3.2 Pharmakokinetik und Chemosensibilisierung

Ein weiterer Mechanismus, der zur Wirkungssteigerung von Chemotherapeutika in Verbindung mit Imidazolen führen kann, stellt die verminderte Abbaurate der Chemotherapeutika in der Leber dar (16, 65).

Dies erfolgt mittels Hemmung der entsprechenden Enzyme schon nach einmaliger Gabe von hohen Dosen Misonidazol beispielsweise.
Da dieser Effekt bei kontinuierlicher Langzeitgabe von geringen Dosen Misonidazol nicht zu verzeichnen ist und die Verabreichung hoher Konzentrationen in vivo durch die Neurotoxizität ihre Beschränkung erfährt, kann dieser Mechanismus nicht von ausschlaggebender Bedeutung für eine klinische Anwendung sein.

4.3 Interpretation der eigenen Ergebnisse

Im Folgenden soll eine Deutung der Versuchsergebnisse, soweit dies nach den bisherigen Erläuterungen noch nötig ist, erfolgen.
Den Erklärungen zu den einzelnen Versuchen liegen die beschriebenen Wirkungsmechanismen der Nitroimidazole zugrunde.

4.3.1 Mögliche Ursachen für die Wirkschwelle von MNCI

Grundlage für die ab einer definierten Schwelle von 7×10^{-5} M MNCI abrupt einsetzende Wirkung dürfte das Prinzip der subletalen Konditionierung oder der "potentially lethal damage" = PLD sein.
Um welche Mechanismen es sich im einzelnen handelt, die in ihrem Zusammenwirken schließlich subletale Schäden verursachen, die von Reparaturenzymen nicht mehr bewältigt werden können, ist nicht eindeutig festlegbar. Als Einzeleffekte kommen folgende in Betracht :

- Die über Redox-Beziehungen hervorgerufenen Veränderungen im Glutathionvorrat der Zelle.
  Im Repairsystem für oxidierte und damit geschädigte Zellsubstanz spielt Glutathion und für dieses wiederum seine Reduktase eine entscheidende Rolle. Beide werden durch die MNCI-Wirkung verändert bzw. verbraucht.
- Die in hypoxischer Umgebung mögliche Bildung von toxischen Zwischenprodukten aus dem Metabolismus von MNCI.
- Die Alkylierung von Makromolekülen, die dann zu Strangbrüchen und Fehlvernetzungen bzw. falscher Transskription führen kann.

- Die Steigerung des mikrosomalen O_2-Verbrauchs durch MNCI, die für die Zelle zusätzliche Hypoxie und damit Ansäuerung des Milieus, Absinken des pH-Wertes und erneut eine Zunahme der MNCI-Wirkung bedeutet.

4.3.2 Wirkungsverstärkung von 5-FU und MTX durch MNCI

Auch für das Verständnis des Effekts unter Einwirkung von ineffektiven Dosen 5-FU und MTX in Verbindung mit der Schwellenwertkonzentration von MNCI ist die Kenntnis der subletalen Konditionierung durch Nitroimidazole nötig.
MNCI wurde in der Konzentration eingesetzt, die mit Sicherheit nicht wachstumshemmend, wohl aber diskret zytotoxisch wirkt (, 7×10^{-5} M).
Damit sind die Voraussetzungen für eine PLD gegeben. Auch für diesen Versuch ist anzunehmen, daß die Vielzahl möglicher MNCI-Wirkungen zusammengenommen eine Zellschädigung setzt, welche dann wegbereitend für den Angriff der zugesetzten Antimetabolite ist.
Die "Vorbereitung" der Zelle durch das Imidazolderivat ermöglicht ihre letale Schädigung durch Zusatz unwirksamer Dosen von 5-FU und MTX. Auch der umgekehrte Weg ist zumindest denkbar, wurde aber hier nicht untersucht.

MTX kann als Hemmstoff im Folsäurestoffwechsel durch kompetitive Verdrängung des Substrats Dihydrofolsäure vom Enzym Dihydrofolatreduktase eine Störung in der DNS-Synthese verursachen, die erst in Verbindung mit den MNCI-Schädigungen Bedeutung erlangt.

Die gleichen Überlegungen lassen sich auf 5-FU anwenden, welches durch die Hemmung der Thymidylat-Synthetase sowie durch den falschen Einbau von FdUTP in die DNS und von FUTP in die RNS die Nukleinsäure-Biosynthese verlangsamt und auf diese Weise mit MNCI gemeinsam zum Zelltod führt.

Daß MNCI jedoch der größte Anteil der zytotoxischen Wirkung zukommt, läßt sich daraus erkennen, daß unwirksame Konzentrationen von MNCI, die nicht an der Wirkschwelle liegen, im Kombinationsversuch mit 5-FU und MTX keinen Summationseffekt erzielen konnten, selbst dann nicht, wenn beide Antimetaboliten in höherer, wirksamer Dosierung verabreicht wurden.

Damit muß die subletale Schädigung durch das Imidazol in der hierzu notwendigen Konzentration von 7×10^{-5} M für das Ergebnis unserer Untersuchungen als unabdingbare Voraussetzung gesehen werden.

Für die Kombination mit Azathioprin gilt :
AZA wurde ebenfalls in einer Konzentration eingesetzt, die mit der Schwelle von MNCI vergleichbar ist.
Bereits am Absterbeverhalten der Kulturen ist zu erkennen, daß die aus dem AZA Metabolismus freigesetzte Menge an MNCI nicht der Schwellenkonzentration entsprechen kann, da die erzielten Kombinationseffekte in der Verbindung mit MTX in nur geringem Ausmaß vorhanden sind. Hier scheint der Zeitfaktor eine wichtige Rolle zu spielen, um die Zellen entsprechend subletal schädigen zu können.

Aus Abb. 16 (Seite 65) wird ersichtlich, daß erst nach 72 Stunden eine deutliche Steigerung der Zahl der toten Zellen

im Vergleich zur AZA-Kontrollkurve zu verzeichnen ist. Ein noch vorhandenes, aber gehemmtes Wachstum, das über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg erkennbar ist, kann mit den ständigen intrazellulären Reparaturvorgängen erklärt werden, die die Mitoserate bremsen. Für eine Steigerung der Wirkung von 5-FU reichen die AZA-Schädigungen nicht aus, um eindeutig einen Synergismus zu erzielen. Hier mag auch der andersgeartete Wirkungsmechanismus von 5-FU ausschlaggebend sein, der eine DNS-Synthese erlaubt, nur die Geschwindigkeit der Biosynthese beeinflußt. Hier kommt wohl der alleinige AZA-Effekt zum Tragen, der in der eingesetzten Konzentration nicht ausreicht, um ernsthaften Schaden zu setzen.

Zusammenfassend kann man feststellen :

MNCI kann in Schwellenkonzentration gegeben, subletalen Schaden verursachen, der bei zusätzlicher Verabreichung von unwirksamen Konzentrationen der Antimetabolite MTX und 5-FU die Zelle für deren Wirkungsmechanismus empfindlich macht und diese somit durch ein Zusammenwirken aller möglichen Effekte letal geschädigt wird.

4.3.3 Schlußfolgerungen aus der 6-MP-Wirkung

Aus der vergleichenden Betrachtung von AZA und 6-MP in der Verlaufsdarstellung des Zellwachstums läßt sich deutlich ableiten, daß gleiche Konzentrationen von AZA und 6-MP völlig unterschiedliche Auswirkungen nach sich ziehen.
Damit entsteht zumindest im Modell der LS_2-Kulturen 6-MP auf keinen Fall in äquimolarem Ausmaß als Metabolit aus einer gegebenen AZA-Konzentration.

In den dargestellten Testkombinationen kann für AZA und seine Zusatzstoffe (MTX, MNCI, 5-FU) das aus 4.3.2 Bekannte angeführt werden. Im Falle der MNCI-Zugabe erfolgt eine geringe zytotoxische Wirkungsverstärkung durch zusätzlichen subletalen Schaden.
Für die Verbindungen 6-MP mit 5-FU und MTX kann außer der Wirkung des Purinantagonisten keine zusätzliche Steigerung erkannt werden. 6-MP liegt hier in einer Konzentration vor, die eine volle Hemmung auf Purinbasen und Purinnukleotide bewirkt, wobei nicht mehr von einer subletalen Schädigung gesprochen werden kann. Damit können die Antimetabolite keine Wirkung mehr entfalten, da die Zellen nicht nur sensibilisiert, sondern stark geschädigt sind.
Mit MNCI in Verbindung gebracht, kann lediglich der Prozentsatz der toten Zellen nochmals gesteigert werden, indem auch das Imidazolderivat seinen Beitrag zur Zellschädigung in der Wirkschwellenkonzentration leistet.

Daraus läßt sich für die AZA-Wirkung folgender Schluß ziehen : In niedriger Dosierung ($8 x 10^{-6}$M) führt AZA, gemessen an der Wirkung von 6-MP, zu einer PLD.
Die Zytotoxizität kann nur zum Teil auf das freigesetzte 6-MP zurückgeführt werden.
Geringe PLD und geringe zytostatische Effekte von 6-MP führen zur Verminderung der Lymphozyten-Stimulierbarkeit.

5 Zusammenfassung

Pharmakologisches Substrat dieser Arbeit war das Imidazolderivat MNCI (= 1-Methyl-4-Nitro-5-Chloro-Imidazol), welches im intrazellulären Stoffwechsel aus dem immunsuppressiv wirksamen Medikament Azathioprin (= AZA) neben 6-Mercaptopurin (6-MP) und weiteren Imidazolderivaten entsteht. Es wurden die Dosis-Wirkungs-Beziehungen für die Zytotoxizität des MNCI ermittelt und seine Interaktionen mit anderen Zytostatika untersucht, wobei als zelluläres Substrat eine in unserem Labor gezüchtete Lymphoblastenkultur "LS_2" diente.

Ein zytostatischer Effekt auf das Zellwachstum wurde für Konzentrationen >7 x 10^{-5}M MNCI ermittelt, wobei diese Konzentration eine Wirkschwelle darstellt, oberhalb der die Hemmung des Kulturwachstums schlagartig einsetzt. Diese Wirkschwellendosis von MNCI wurde mit niedrigen, zytostatisch ineffektiven Dosierungen von 5-Fluorouracil (= 5-FU) und Methotrexat (= MTX) kombiniert und in ihrer Wirkung mit den entsprechenden AZA-Kombinationen verglichen. Als eben unwirksame Schwellendosierungen galten :

Azathioprin	:	8 x 10^{-6}M
MNCI	:	7 x 10^{-5}M
5-FU	:	1 x 10^{-6}M
MTX	:	2,5 x 10^{-8}M

Für AZA konnte nur in der Verbindung mit MTX eine zytostatisch/zytotoxische Beeinflussung des Zellwachstums nachgewiesen werden. Die Kombination von MNCI mit 5-FU und MTX ergab einen deutlichen Effekt auf Wachstum und Absterbeverhalten der LS_2-Kultur, obwohl die Konzentrationen der einzelnen Medikamente unwirksam waren.

Ferner wurden zu AZA äquimolare Konzentrationen des AZA-Spaltproduktes 6-MP untersucht. Im Gegensatz zu AZA führte 8 x 10^{-6}M 6-MP zu einem deutlichen zytostatisch/zytotoxischen Effekt. Bei der Kombination von 6-MP mit 5-FU und MTX konnte nur der alleinige Wirkungsumfang von 6-MP gefunden werden. Bei der Kombination von 6-MP mit MNCI hingegen übertraf der Effekt im Sinne einer Addition die alleinige 6-MP-Wirkung. 6-MP besitzt damit im äquimolaren Vergleich zu AZA die größere Toxizität. D. h. im Stoffwechsel der LS_2-Kultur wird AZA nicht quantitativ zu 6-MP metabolisiert.

Für MNCI in Wirkschwellenkonzentration wird eine subletale Konditionierung (= potentially lethal damage = PLD) im Sinne einer Vorschädigung der Zellen diskutiert werden, die bei zusätzlichen, das Zell-Repair-System fordernden Faktoren (z. B. niedrig dosierte Zytostatika) für die zytotoxische Wirkung der Schwellendosierung ursächlich sein dürfte. Im Repair-System spielen Glutathion und seine Reduktase eine Rolle. Beide werden durch MNCI verbraucht bzw. in ihrer Aktivität beeinträchtigt und stehen damit für die Reparatur oxygenierter, geschädigter Makromoleküle nicht mehr ausreichend zur Verfügung. In diesem Sinne sind die Zellen "vorgeschädigt". Eine solche subletale Konditionierung oder auch Chemosensibilisierung durch MNCI, die vorwiegend im hypoxischen Tumorgewebe stattfindet, wäre ein Ansatz für die Verwendung geringerer Konzentrationen von bekannten Zytostatika unter Beibehaltung ihres Wirkungsspektrums. Möglicherweise könnte dadurch die therapeutische Breite der Zytostatika verbessert werden : weniger akute Toxizität auf schnell proliferierende Wechselgewebe (Knochenmark, Schleimhäute) bzw. weniger Spättoxizität (Karzinogenese, Mutagenese).

6 Literaturverzeichnis

1. Adams, G.E., Cooke, M.S. : Electron-affinic sensitization : Structural basis for chemical radiosensitizers in bacteria. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 15 (1969) 457 - 471.

2. Adams, G.E., Dewey, D.L. : Hydrated electrons and radiobiological sensitization. Biochem. Biophys. Res. Comm. 12 (1963) 473 - 477.

3. Adams, G.E., Stratford, I.J. : Hypoxia-dependent radiation-sensitizers and chemotherapeutic agents. p. 403 - 404. In : Bertino, J.R., Laza, J.S., Sartorelli, A.C., (eds.) : Molecular Actions and Targets for Cancer Chemotherapeutic Agents. Vol. 2, Academic Press, New York - London - Toronto (1981).

4. Adams, G.E., Asquith, J.C., Dewey, D.L., Foster, J.L., Michael, B.D., Willson, R.L. : Electron-affinic sensitization II : paranitroactetophenone, a radiosensitizer for anoxic bacterial and mammalian cells. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 19 (1971) 575 - 585.

5. Adams, G.E., Flockhart, I.R., Smithen, C.E., Stratford, I.J., Wardman, P., Watts, M.E. : Electron-affinic sensitization. VII : a correlation between structures, one-electron reduction potentials and efficiencies of nitroimidazoles as hypoxic cell radiosensitizers. Radiat. Res. 67 (1976) 9 - 20.

6. Adams, G.E., Fowler, J.F., Wardman, P., eds. : Hypoxic cell sensitizers in radiobiology and radiotherapie. Br. J. Cancer 37 (1978) III.

7. Adams, G.E., Clarke, E.D., Flockhart, I.R., et al.: Structure-activity-relationships in the development of hypoxic cell radiosensitizers : sensitization efficiency. Int. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 35 (1979) 133 - 150.

8. Adams, G.E., Ahmed, I., Fielden, E.M., O'Neill, P., Stratford, I.J. : The development of some nitroimidazoles as hypoxic cell sensitizers. Cancer Clin. Trials 3 (1980) 37 - 42.

9. Adams, G.E., Dawson, K., Stratford, I.J. : Electron-affinic radiation sensitizers for hypoxic cells : prospects and limitations with present and future drugs. p. 84 - 95. In : Kärcher, Kogelnik and Meyer, eds. : Progress in Radio-Oncology, Proceedings of International Symposium Baden, Austria, May 1978. Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York (1980).

10. Adams, G.E., Stratford, I.J., Wallace, R.G., Wardman, P. , Watts, M.E. : Toxicity of nitro compounds toward hypoxic mammalian cells in vitro : dependence on reduction potential. J. Natl. Cancer Inst. 64 (1980) 555 - 560.

11. Abe, M., Suyuma, M., Takahashi, M., Nishidai, T., Yukawa, Y. : Radiosensitizing effects of Ro 07-0582 on experimental animal tumors : proceedings 6th International Congress on Radiation Research, Tokyo, May 1979, 867 - 874.

12. Ash, D.V., Smith, M.R. : Distribution on misonidazole in human tumors and normal tissues. Br. J. Cancer 39 (1979) 503 - 509.

13. Asquith, J.C., Watts, M.E., Patel; K.B., Smithen, C.E., Adams, G.E. : Electron-affinic sensitization V : radiosensitization of hypoxic bacterian and mammalian cells in vitro by some nitroimidazoles and nitropyrazoles. Radiat.Res. 60 (1974) 108 - 118.

14. Biaglow, J.E., Issels, R.D., Gerwick, L.E., Varnes, M.E., Jacobsen, B., Mitchell, J.B., Russo, A. : Factors influencing the oxidation of cysteamine and other thiols : implications for human hyperthermic sensitization and radiation protection. Radiat. Res. 100 (1984) 298 - 312.

15. Bleehen, N.M. : A radiotherapist's view of radiosensitizers in "Modifications of Radiosensitivity of Biological Systems". IAEA Report, Vienna (1979) 1 - 9.

16. Brady, L.W. : Radiation Sensitizers : their Use in the Clinical Management of Cancer. Cancer Management, vol. 5 (1980), New York Masson Publishing USA Inc.

17. Bridges, B.A. : Sensitization of Escherichia coli to gamma radiation by N-ethylmaleimide. Nature 188 (Lond. 1960) 415.

18. Brown, J.M. : The mechanism of cytotoxity and chemosensitization by misonidazole and other nitroimidazoles. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 8 (1982) 675 - 682.

19. Brown, J.M. : Clinical trials of radiosensitizers : what should we expect? Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 10 (1984) 425 - 429.

20. Brown,. J.M., Hirst, D.G.: Effect of clinical levels of misonidazole on the response of tumour and normal tissues in the mouse to alkylating agents. Br. J. Cancer 45 (1982) 700 - 708.

21. Brown, J.M., Yu, N.Y., Cory, M.J., Bicknell, R.B., Taylor, D.L. : In vivo evaluation of the radiosensitizing and cytotoxic properties of newly synthesized electron-affinic drugs. Br. J. Cancer 37, Suppl. III (1978) 206 - 211.

22. Brown, D.M., Parker, E.T., Brown, J.M. : In vitro radiosensitization and cytotoxity of 2-nitroimidazoles with different lipophilizity. (Abstract). Twenty-eight Annual Meeting of the Radiation Research Society, New Orelans, Louisiana, June 1 - 5 (1980).

23. Bush, R.S., Jenkin, R.D.T., Allt, W.E.C., et. al. : Definitive evidence for hypoxic cells influencing cure in cancer therapy. Br. J. Cancér 37, Suppl. III (1978) 302 - 306.

24. Chapman, J.D., Webb, R.G., Borsa, J. : Radiosensitization of mammalian cells by p-nitroacetophenone : characterisation in asynchronous and synchronous populations. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 19 (1971) 561 - 573.

25. Chapman, J.D., Reuvers, A.P., Borsa, J., Petkau, A., Mc Calla, D.R. : Nitrofurans as radiosensitizers of hypoxic mammalian cells. Cancer res. 32 (1972) 2616 - 2624.

26. Churchill-Davidson, I., Foster, C.A., Wiernik, G., et al. : The place of oxygen in radiotherapy. Br. J. Radiol. 39 (1966) 321 - 331.

27. Clarke, C., Dawson, K.B., Sheldon, P.W., Chaplin, D.J., Stratford, I.J. : A quantitative cytochemical method for assessing the neurotoxity of the radiosensitizer misonidazole. p. 245 - 249. In : Brady, L.W., ed. : Radiation Sensitizers : Their Use in the Clinical Management of Cancer. Cancer Management, vol. 5, Masson Publishing USA Inc., New York (1980).

28. Clement, J.J., Johnson, R.K.: Evaluation of radiosensitizers in combination with chemotherapeutic agents in solid tumors. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 8 (1982) 631 - 634.

29. Colemen, C.N. et al. : Phase I trial of intravenous L-phenylalanine plus the sensitizer misonidazole. Cancer Res. 43 (1983) 5022 - 5025.

30. Conroy, P.J., Von Burg, R., Passalacqua, W., Penney, D.P., Sutherland, R.M. : Misonidazole neurotoxity in the mouse : evaluation of functional, pharmacokinetic, electrophysiologic and morphologic features. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 5 (1979) 983 - 991.

31. Conroy, P.J., Shaw, A.B., Mc Neill, T.H., Passalacqua, W., Sutherland, R.M. : Radiation sensitizer neurotoxity in the mouse. p. 397 - 410. In : Brady, L.W., ed. : Radiation Sensitizers : Their Use in the Clinical Management of Cancer. Cancer Management vol. 5, Masson Publishing USA Inc., New York (1980).

32. Courtenay, V.D., Smith, I.E., Steel, G.G. : The effect of misonidazole on the radiation response of clonogenic human pancreatic carcinoma cells. Br. J. Cancer 37 (1978) 225 - 227.

33. Denekamp, J. : Cytotoxity and radiosensitization in mouse and man. Br. J. Radiol. 51 (1978) 636 - 637.

34. Denecamp, J.D., Hirst, D.G., Stewart, F.A., Terry, N.H.A. : Is tumor radiosensitization by misonidazole a general phenomenon? Br. J. Cancer 40 (1980) 1 - 9.

35. Dische, S., Gray, A.J., Zanelli, G.D. : Clinical testing of the radiosensitizer Ro 07-0582: Radiosensitization of normal and hypoxic skin. Clin. Radiol. 27 (1976) 159 - 166.

36. Edgren, M. : Depletion of cellular thiols by misonidazole treatment prevents some postirradiation repair processes. Br. J. Radiol. 56 (1983) 211 - 212.

37. Foster, J.L., Willson, R.L. : Radiosensitization of anoxic cells by metronidazole. Br. J. Radiol. 6 (1973) 234 - 235.

38. Fowler, J.F., Denekamp, J.D. : A review of hypoxic cell radiosensitization in experimental tumors. Pharmacol. Therapeut 7 (1980) 413 - 444.

39. Goodman, L.S., Gilman, A. : Chemotherapy of Neoplastic Diseases. p. 1274 - 1276. In : Calabresi, P., Robert, E., Parks, S. : Chemotherapy of Neoplastic Diseases. Macmillan Publishing Co. Inc., New York, London, Toronto (1975)

40. Guichard, M., De Langen-Omri, F., Malaise, E. : Influence of misonidazole on the radiosensitivity of a human melanoma in male mice : time-dependent increase in surviving fraction. Int. J. Radiol. Oncol. Biol. Phys. 5 (1979) 487 - 489.

41. Hall, E.J., Roizin-Towle, L. : Hypoxic sensitizers: radiobiological studies at the cellular level. Radiobiology 117 (1975) 453 - 457.

42. Hall, E.J., Aster, M., Geard, C., Biaglow, J. : Cytotoxity of Ro 07-0582 : enhancement by hyperthermia and protection by cysteamine. Br. J. Cancer 35 (1977) 809 - 815.

43. Hantke, U. : Die zytostatische und zytotoxische Wirkung von Azathioprin und seiner Imidazol-Metaboliten auf Lymphoblastenkulturen. Thesis, München (1987).

44. Harris, J.R., Timberlake, N., Henson, P., Schimke, P., Belli, J. : Adriamycin uptake in V79 and Adriamycin resistant Chinese hamster cells. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 5 (1979) 1235 - 1239.

45. Hart, E.J., Boag, J.W. : Absorption spectrum of the hydrated electron in water and in aqueous solution. J. Am. Chem. Soc. 84 (1962) 4090 - 4095.

46. Henk, J.M., Smith, C.W. : Radiotherapy and hyperbaric oxygen in head and neck cancer. Lancet 2 (1977) 104 - 105.

47. Hirst, D.G., Brown, J.M. : The therapeutic potential of misonidazole enhancement of alkylating agent cytotoxity. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 8 (1982) 639 - 642.

48. Hirst, D.G., Vojnovic, B., Stratford, I.J., Travis, E.L. : The effect of the radiosensitizer misonidazole on motor nerve conduction activity in the mouse. Br. J. Cancer 37 (1978) 237 - 241.

49. Hirst, D.G., Hazelhurst, J.L., Brown, J.M. : Sensitization of normal and malignant tissues to cyclophosphamide by nitroimidazoles with different partition coefficients. Br. J. Cancer 49 (1984) 33 - 42.

50. Josephy, P.D., Palcic, B., Skarsgard, L.D. : Ascorbate enhanced cytotoxity of misonidazole. Nature 271 (1978) 370 - 371.

51. Koch, C., Howell, R.L.,Biaglow, J.E. : Ascorbate ion potentiates cytotoxity of nitro-aromatic compounds under hypoxic and anoxic conditions. Br. J. Cancer 39 (1979) 321 - 328.

52. Lee, F.Y.F., Workman, P. : Modification of CCNU pharmacokinetics by misonidazole - A major mechanism of chemosensitization in mice. Br. J. Cancer 47 (1983) 659 - 669.

53. Lee, F.Y.F., Workman, P. : Misonidazole and CCNU : further evidence for a pharmacokinetic mechanism of chemosensitization and therapeutic gain. Br. J. Cancer 49 (1984) 579 - 585.

54. Martin, W.M.C., Mc Nally, N.J. : The cytotóxic action of Adriamycin and cyclophosphamide on tumor cells in vitro and in vivo. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 5 (1979) 1309 - 1312.

55. Mc Nally, N.J., Hinchliffe, M., de Ronde, J. : Enhancement of the action of alkylating agents by single high, or chronic low doses of misonidazole. Br. J. Cancer 48 (1983) 271 - 278.

56. Meisel, D., Czapski, G. : One-electron transfer equilibrium and redox potentials of radicals studied by pulse radiolysis. J. Am. Chem. Soc. 79 (1975) 1503 - 1509.

57. Michael, B.D., Adams, G.E., Hewitt, H.B., Jones, W.B.G., Watts, M.E. : A post-effect of oxygen in irradiated bacteria : a submillisecond fast-mixing study. Radiat. Res. 54 (1973) 239 - 251.

58. Midander, J., Deschavanne, P.-J., Malaise, E.-P., Revesz, L. : Survival curves of irradiated glutathione-deficient human fibroblasts : indication of a reduced enhancement of radio-sensitivity by oxygen and misonidazole. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 8 (1982) 443 - 446.

59. Millar, B.C., Jinks, S. : In vitro inhibition of misonidazole toxicity and melphalan chemopotentiation by matapyrone. Br. J. Radiol. 56 (1983) 201 - 206.

60. Mohindra, K.J., Rauth,A.M. : Increased cell killing by metronidazol and nitrofurazone of hypoxic compared to aerobic mammalian cells. Cancer Res. 36 (1976) 930 - 936.

61. Mulcahy, R.T. : Chemical properties of nitro- soureas : implications für interaction with misonidazole. Int. J. Radiat..Oncol. Biol. Phys. 8 (1982) 599 - 602.

62. Mulcahy, R.T., Siemann, D.W. : In vitro chemo- sensitization by misonidazole in sensitive and resistant tumor lines. Cancer Res. 43 (1983) 4709 - 4713.

63. Mulcahy, R.T., Dembs, N.L., Ublacker, G.A. : Enhancement of nitrosourea cytotoxicity by misonidazole in vitro : correlation with carbomoylating potential. Br. J. Cancer 49 (1984) 307 - 313.

64. Nakagawa, K., Tsunemoto, H., Watanabe, I. : Effect of misonidazole on the radiosensitivity and repair of potentially lethal damage of L5178Y ascites tumor dells. Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 19 (1983) 527 - 532.

65. Narayanan, V.L., Lee, W.W. : Development of Radiosensitizers : A Medical Chemistry Perspective. p. 155 - 205. In : Garattini, S., Hawking, F., Goldin, A., Kopin, I.J. (eds.) : Advances in Pharmakology and Chemotherapy. Vol. 19. Academic Press, New York (1982)

66. Ono, K., Nakatima, T., Hiraoka, M., Matsumiya, A., Onoyama, Y. : Radiosensitizing effects of Misonidazole on mammary carcinoma of C3H mice. Kawasaki Med. J. 4 (1978) 183 - 191.

67. Overgaard, J. : Effect of misonidazole and hyperthermia on the radiosensitivity of a C3H mouse mammary carcinoma and its surrounding normal tissues. Br. J. Cancer 41 (1980) 10 - 21.

68. Phillips, T., Wasserman, T.H. : Promise of radiosensitizers and radioprotectors in the treatment of human cancer. Cancer Treat. Rep. 68 (1984) 291 - 302.

69. Raleigh, J.A., Chapman, J.D., Borsa, J., Kremers, W., Reuvers, A.P. : Radiosensitization of mammalian cells by p-nitroacetophenone : effectiveness of nitrobenzene analogues. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 23 (1973) 377 - 387.

70. Rockwell, S. : Cytotoxic and radiosensitizing effects of hypoxic cell sensitizers on EMT6 Mouse mammary cells in vivo and in vitro. Br. J. Cancer 37 (1978) 212 - 215.

71. Rofstad, E.R., Brudstad, T. : The radiosensitizing effect of metronidazole and misonidazole (Ro 07-0582) on a human malignant melanoma grown in the athymic mutant nude mouse. Br. J. Radiol. 51 (1979) 381 - 386.

72. Roizin-Towle, L., Hall, E.J. : Studies with bleomycin and misonidazole on aerated and hypoxic cells. Br. J. Cancer 37 (1978) 254 - 260.

73. Rose, G.P., Dewar, A.J., Stratford, I.J. : A biochemical method for assessing the neurotoxic effects of hypoxic cell radiosensitizers : experience with misonidazole in the rat. Br. J. Cancer 42 (1980) 890 - 899.

74. Rose, C.M., Millar, J.L., Peacock, J.H., Phelps, T.A., Stephens, T.C. : Differential enhancement of melphalan cytotoxicity in tumor and normal tissue by misonidazole. p. 250 - 257. In : Brady, L.W., ed. Radiation Sensitizers : Their Use in the Clinical Management of Cancer. Cancer Management, vol. 5, Masson Publishing USA Inc., New York (1980).

75. Sheldon, P., Fowler, J.F. : Radiosensitization by misonidazole (Ro 07-0582) of fractionated x-rays in a murine tumour. Br. J. Cancer 37 (Supplement III, 1978) 242 - 245.

76. Sheldon, P.W., Gibson, P. : Effect of nitroimidazole Ro 03-8799 on the activity of chemotherapeutic agents against a murine tumour in vivo. Br. J. Cancer 49 (1984) 291 - 300.

77. Simic, M., Powers, E.L. : Correlation of the efficiencies of some radiation sensitizers and their redox potentials. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 26 (1964) 87 - 90.

78. Smith, E., Stratford, I.J., Adams, G.E. : Cytotoxity of Adriamycin on aerobic and hypoxic Chinese hamster V79 cells in vitro. Br. J. Cancer 41 (1980) 568 - 573.

79. Somafi-Relle, S., Suzukake, K., Vistica, B.P., Vistica, D.T. : Glutathione conferred resistance to antineoplastics : approaches toward its reduction. Cancer Treat. Rev. 11 (Supplement A, 1984) 43 - 54.

80. Stanley, J.A., Peckham, M.J., Steel, G.G. : Influence of tumor size on radiosensitization by misonidazole. Br. J. Cancer 37 (Supplement III, 1978) 220 - 224.

81. Stecher, A., Lutz, D. : Antineoplastische Chemotherapie IV S. 318 in : Kuemmerle, H.P., Kitzenberger, G., Spitzy, K.-H., : Klin. Pharmakologie, ecomed Verlagsgesellschaft, Landsberg, München (4. Auflage 1984).

82. Steel, G.G., Adams, K., Stanley, J. Size dependence of the pesponse of Lewis lung tumors to BCNU. Cancer Treat. Rep. 60 (1976) 1743 - 1748.

83. Stone, H. : Enhancement of local tumor control by misonidazole and hyperthermia. Br. J. Cancer 37 (Supplement III, 1978) 178 - 183.

84. Stratford, I.J. : The development of hypoxic cell sensitizers for clinical use. p. 116 - 130. In : Symington T., Canter, R., eds. : Scientific Foundations of Oncology, Supplement London (1980) Wm. Heinemann.

85. Stratford, I.J., Adams, G.E. : Effect of hyperthermia on differential cytotoxicity of a cell radiosensitizer, Ro-07-0582, on mammalian cells in vitro. Br. J. Cancer 35 (1977) 307 - 313.

86. Suit, H.D., Brown, J.M. : Relative efficiency of high pressure oxygen and misonidazole to reduce TCD_{50} of a mouse mammary carcinoma. Br. J. Radiol. 52 (1979).

87. Sutherland, R.M., Selective chemotherapy of noncycling cells in an in vitro tumor model. Cancer Res. 34 (1974) 3501 - 3503.

88. Sutherland, R.M., Bareham, B.J., Reich, K.A. : Cytotoxicity of hypoxic cell sensitizers in multicell spheroids. p. 107 - 117. In : Brady, L.W., ed. Radiation Sensitizers : Their Use in the Clinical Management, vol. 5, Masson Publishing USA Inc., New York (1980).

89. Tannock, I.F., : In vivo interaction of anti-cancer drugs with misonidazole or metronidazole: methotrexate, 5-fluorouracil and adramycin. Br. J. Cancer 42 (1980), 861 - 870.

90. Thomlinson, R.H., Dische, S., Gray, A.J., Errington, L.M. : Chemical testing of the radiosensitizer Ro 07-0582 : response of tumours. Clin. Radiol. 27 (1976) 167 - 174.

91. Twentyman, P.R., Workman, P. : An investignation of the possibility of chemosensitization by clinically achievable concentrations of misonidazole. Br. J. Cancer 47 (1983) 187 - 194.

92. Twentyman, P.R., Workman, P. : Meeting Report-Second U.K. Workshop on the enhancement of chemotherapy by nitroimidazoles. Br. J. Cancer 47 (1983) 553 - 554.

93. Twentyman, P.R., Workman, P.: Chemosensitization by lipophilic nitroimidazoles. Br. J. Cancer 48 (1983) 17 - 26.

94. Urtasun, R.C., Band, P., Chapman, J.D., Feldstein, M.C., Mielke, B., Fryer, C. : Radiation and high dose metronidazole (Flagyl) in supratentorial glioblastomas. N. Engl. J. Med. 294 (1976) 1364 - 1367.

95. Urtasun, R.C., Chapman, J.D., Feldstein, M.L., et al. : Peripheral neuropathy related to misonidazole : incidence and pathology. Br. J. Cancer 37 (Supplement III, 1978), 271.

96. Varghese, a.J. : Glutathione conjugates of misonidazole. Biochem. Biophys. Res. Commun. 112 (1983) 1013 - 1020.

97. Varghese, A.J. : Whitmore, G.F. : Binding to cellular macromulecules : a possible mechanism of the cytotoxicity of misonidazole. Cancer Res. 40 (1980) 2165 - 2169.

98. Varghese, A.J., Gulyas, S., Mohindra, J.K. : Hypoxia dependent reduction of 1-(2-nitro-1-imidazolyl)-3-methoxy-2-propanol by Chinese hamster ovary cells and KHT tumour cells in vitro and in vivo. Cancer Res. 36 (1976) 3761 - 3765.

99. Watson, E.R., Halnan, K.E., Dische, S., et al. : Hyperbaric oxygen and radiotherapy : a Medical Research Council trial in carcinoma of the cervix. Br. J. Radiol. 51 (1978) 879 - 887.

100. Weetman, A.P., Holt, M.E., Campbell, A.K., Hall, R., Mc Gregor, A.M. : Methimazole and generation of oxygen radicals by monocytes : potential role in immunosuppression. Br. Med. J. 288 (1984) 518 - 520.

101. Whitmore, G.F., Gulyas, S. : Lethal and sublethal effects of misonidazole under hypoxic conditions. p. 99 - 106. In : Brady, L.W., ed. Radiation Sensitizers : Their Use in the Clinical Management of Cancer. Cancer Management, vol. 5, Masson Publishing USA Inc., New York (1980).

Tabellarischer Lebenslauf

Name	:	Reingard, Ilse H e r b s t
Geb.Datum	:	28.01.1959
Geb.Ort	:	Augsburg
Konfession	:	lutherisch-evangelisch
Familienstand	:	ledig
Vater	:	Josef Maximilian Herbst, Malermeister verst. : 05.03.1975
Mutter	:	Ilse Herbst, geb. Greinbold, Hausfrau verst. : 11.01.1986
Schulbildung	:	Pestalozzi-Volksschule in Augsburg Sept. 65 - Juli 69 Jakob-Fugger-Gymnasium in Augsburg Sept. 69 - Juni 78 Abitur im Juni 1978 Ludwig-Maximilians-Universität München Nov. 78 - April 85 Approbation im April 1985
Berufl. Werdegang	:	Assistenzärztin in der II. Kinderklinik des KZV Augsburg seit September 1985, Abteilung Entwicklungsneurologie, vorzugsweise neuropädiatrisch im Rahmen des Forschungsvorhabens "ARVO-YLPPÖ-Studie" tätig.